



11281  
28

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**Redundancia génica en *Saccharomyces cerevisiae*:**  
**Estudio bioquímico y fisiológico de las glutamato**  
**deshidrogenasas anabólicas**

**T E S I S**

que para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

presenta

**BIOL. ALEXANDER DE LUNA FORS**

**Asesora: Dra. Alicia González Manjares**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**PAGINACION**

**DISCONTINUA**

Este trabajo de Tesis doctoral se llevó a cabo en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, en el laboratorio a cargo de la Dra. Alicia González Manjarrez.

El trabajo de investigación fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto 31774) y por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (Proyecto IN212898). Además, se recibió una Beca para estudios de Doctorado (febrero de 1997 a enero de 2002) y dos donativos (PAEP-201323 y PAEP-102315) por parte de la Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM.

El Comité Tutoral estuvo conformado por los doctores Fernando Bastarrachea Avilés, Guadalupe Espín Ocampo y Alicia González Manjarrez.

Los doctores Arturo Becerra Bracho, Julio Collado Vides, Socorro Durán Vargas, Armando Gómez Puyou, Diego González Halphen, Alicia González Manjarrez y Luis Servín González revisaron críticamente este documento y conformaron el Jurado de Examen de Grado.

María Elvira Fors, Soledad Funes, Lina Riego, Raúl Torres y Paulina Uribe leyeron la primera versión del trabajo escrito e hicieron sugerencias importantes para mejorarla.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## CONTENIDO

i. Resumen .....	1
ii. Resumen en inglés .....	2
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
1. Duplicación de genes y redundancia génica	
2. La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
3. Las glutamato deshidrogenasas	
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>19</b>
<b>III. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....</b>	<b>21</b>
<b>IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>22</b>
1. Aspectos bioquímicos	
2. Aspectos fisiológicos	
3. Consideraciones evolutivas	
<b>V. CONCLUSIONES .....</b>	<b>66</b>
<b>VI. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>67</b>
<b>VII. RESULTADOS PUBLICADOS .....</b>	<b>70</b>
Artículo 1	
<b>VIII. OTROS TRABAJOS .....</b>	<b>80</b>
Artículos 2-5	
<b>IX. REFERENCIAS .....</b>	<b>117</b>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ÍNDICE DE CUADROS

### I. INTRODUCCIÓN

<b>Cuadro 1.</b>	Proporción de genes redundantes presentes en algunos organismos	12
<b>Cuadro 2.</b>	Estructura del genoma de <i>S. cerevisiae</i>	13

### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>Cuadro 3.</b>	Pasos para la purificación de las NADP-GDHs de levadura	45
<b>Cuadro 4.</b>	Parámetros cinéticos (cinética de Michaelis-Menten)	46
<b>Cuadro 5.</b>	Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos (cinética de Hill)	47
<b>Cuadro 6.</b>	Efecto de diferentes compuestos sobre la actividad NADP-GDH	48
<b>Cuadro 7.</b>	Representación de enzimas duplicadas en las vías metabólicas de <i>S. cerevisiae</i>	49

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ÍNDICE DE FIGURAS

### I. INTRODUCCIÓN

<b>Figura 1.</b>	Estructura tridimensional de la GDH de <i>C. symbiosum</i>	14
<b>Figura 2.</b>	Clasificación de los genes de <i>S. cerevisiae</i> con base en su función celular	15
<b>Figura 3.</b>	Duplicación y organización actual del genoma de <i>S. cerevisiae</i>	16
<b>Figura 4.</b>	Metabolismo central del nitrógeno en <i>S. cerevisiae</i>	17
<b>Figura 5.</b>	Alineamiento de <i>GDH1</i> y <i>GDH3</i> con algunas GDHs homólogas	18

### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

<b>Figura 6.</b>	Caracterización electroforética de las NADP-GDHs de <i>S. cerevisiae</i>	50
<b>Figura 7.</b>	Forma oligomérica de las NADP-GDHs de levadura	51
<b>Figura 8.</b>	Análisis cinético comparativo de las NADP-GDHs	52
<b>Figura 9.</b>	Cinética de inhibición competitiva por fosfato	53
<b>Figura 10.</b>	Comportamiento alostérico de Gdh1p y de Gdh3p	54
<b>Figura 11.</b>	Comportamiento alostérico de la muestra purificada de una cepa silvestre	55
<b>Figura 12.</b>	Desnaturalización química de las NADP-GDH	56
<b>Figura 13.</b>	Inactivación de las NADP-GDHs por calor	57
<b>Figura 14.</b>	Susceptibilidad a la desamidación espontánea	58
<b>Figura 15.</b>	Efecto de la presunta desamidación sobre la estabilidad de las proteínas	59
<b>Figura 16.</b>	Efecto del carbono sobre la expresión de las isoenzimas	60
<b>Figura 17.</b>	Expresión de las isoenzimas en cultivos prolongados	61
<b>Figura 18.</b>	Efecto de la privación de glucosa sobre las abundancias de Gdh1p y Gdh3p	62
<b>Figura 19.</b>	Caracterización fisiológica de las mutantes interrumpidas en <i>GDH1</i> o <i>GDH3</i>	63
<b>Figura 20.</b>	Regulación metabólica de las NADP-GDHs de <i>S. cerevisiae</i>	64
<b>Figura 21.</b>	Cladograma de las secuencias de las GDHs de algunas levaduras	65

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## ÍNDICE DE TRABAJOS PUBLICADOS O EN PREPARACIÓN

### VII. RESULTADOS PUBLICADOS

- ARTÍCULO 1      **NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties and physiological roles.** 71  
Artículo en *Journal of Biological Chemistry* (2001)

### VII. OTROS TRABAJOS

- ARTÍCULO 2      ***GDH3* encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*.** 82  
Artículo en *Journal of Bacteriology* (1997)
- ARTÍCULO 3      **Genetic redundancy and the adaptation to facultative metabolism in yeast.** 86  
Capítulo del libro *CIFN XX Anniversary* (G. Hernández, ed.), CIFN-UNAM (2001)
- ARTÍCULO 3      **Transcriptional regulation of the NADP-glutamate dehydrogenase (*GDH1*) of *Saccharomyces cerevisiae*.** 90  
Artículo en revisión (enviado a *Microbiology-UK*)
- ARTÍCULO 4      **La desamidación espontánea de proteínas *in vitro* e *in vivo*.** 111  
de revisión en preparación (para *Boletín de Educación Bioquímica*)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## ABREVIATURAS USADAS

<b>ARS</b>	Secuencia de replicación autónoma
<b>CEN</b>	Centrómero
<b>GDH</b>	Glutamato deshidrogenasa
<b>GOGAT</b>	Glutamato sintasa (glutamato-oxoglutarato amido transferasa)
<b>GS</b>	Glutamino sintetasa
<b>NAD-GDH</b>	Glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD <sup>+</sup>
<b>NADP-GDH</b>	Glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP <sup>+</sup>
<b>nt</b>	Nucleótido(s)
<b>N-terminal</b>	Amino terminal
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto
<b>pb</b>	Par(es) de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>Pi</b>	Fosfato inorgánico (ortofosfato)
<b>PMSF</b>	Fenilmetilsulfonil fluoruro
<b>SDS</b>	Sodio dodecil sulfato
<b>TLCK</b>	N <sup>α</sup> - <i>p</i> -tosil-L-lisina clorometil cetona
<b>YPD</b>	Medio rico de cultivo, con extracto de levadura, peptona y dextrosa

## GENES Y OTRAS NOTACIONES EN *Saccharomyces cerevisiae*

<b>GDH1</b>	NADP-glutamato deshidrogenasa (anabólica), homólogo de <i>GDH3</i>
<b>Gdh1p</b>	Producto del gen <i>GDH1</i>
<b>gdh1Δ</b>	Mutante interrumpida en el gen <i>GDH1</i>
<b>GDH2</b>	NAD-glutamato deshidrogenasa (catabólica)
<b>GDH3</b>	NADP-glutamato deshidrogenasa (anabólica), homólogo de <i>GDH1</i>
<b>Gdh3p</b>	Producto del gen <i>GDH3</i>
<b>gdh3Δ</b>	Mutante interrumpida en el gen <i>GDH3</i>
<b>GLN3</b>	Activador transcripcional de los genes del catabolismo de nitrógeno
<b>GLT1</b>	Glutamato sintasa (GOGAT)
<b>HAP</b>	Sistema de regulación transcripcional que responde a la concentración de oxígeno
<b>p2μ</b>	Plásmido 2μ de alto número de copias (10 a 20 copias)
<b>pCEN</b>	Plásmido centromérico de bajo número de copias (una a tres copias)
<b>RTG</b>	Sistema de regulación que coordina la función mitocondrial y peroxisomal

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## i. Resumen

La redundancia génica es una característica de todos los seres vivos. Los genomas de organismos eucariontes, en particular, presentan una elevada proporción de genes duplicados. De acuerdo con lo anterior, el 29% de los genes de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* tienen un homólogo en el mismo genoma. Existe evidencia de que cerca de la mitad de esta redundancia tiene su origen en una duplicación genómica ancestral, ocurrida hace 100 millones de años. Se ha propuesto que la conservación de genes duplicados pudo haber facilitado el desarrollo de las habilidades anaerobias de este organismo facultativo, a través de la diversificación funcional de algunas proteínas en respuesta a condiciones metabólicas contrastantes. El objetivo principal de este trabajo fue entender el papel fisiológico de la vía glutamato deshidrogenasa anabólica dependiente de NADP<sup>+</sup>, codificada por los genes duplicados *GDH1* y *GDH3*. Ambas isoenzimas fueron purificadas y caracterizadas: entre otras diferencias bioquímicas, mostraron tener propiedades particulares en su comportamiento alostérico por  $\alpha$ -cetoglutarato. Por otra parte, se encontró que la expresión de los genes está regulada de manera diferencial; la presencia relativa de estas proteínas en la célula está controlada por la fuente de carbono del medio de cultivo. Finalmente, el estudio fisiológico de las mutantes que carecen de alguna de las isoenzimas sugiere que cada gen tiene una función particular que el homólogo correspondiente no puede suplir. Los resultados de este trabajo indican que la conservación y diversificación funcional de *GDH1* y *GDH3* es consecuencia de una especialización de la vía al metabolismo facultativo, ya que Gdh1p cataliza la biosíntesis de glutamato durante el crecimiento fermentativo, mientras que la presencia de Gdh3p bajo condiciones respiratorias modula el uso de  $\alpha$ -cetoglutarato sin comprometer el metabolismo energético. El fenómeno aquí descrito podría formar parte del remodelamiento general que tuvo que haber ocurrido durante la adaptación al metabolismo anaerobio facultativo. Por tanto, se discuten otros casos de diversificación funcional, considerando aquellos genes que se han conservado en doble copia desde la duplicación ancestral del genoma de *S. cerevisiae*.

---

## ii. Abstract

Genetic redundancy is a salient feature of living beings. Genomes of eukaryotic organisms, in particular, show an elevated proportion of duplicated genes. According to this, 29% of the genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* have a homologue within the same genome. There is evidence that about half of this redundancy originated from an ancient genome duplication occurring 100 million years ago. It has been proposed that the conservation of duplicated genes may have facilitated the acquisition of the anaerobic abilities of this facultative organism, through the functional diversification of proteins in response to contrasting metabolic conditions. The main goal of the present study was to understand the physiological role of the anabolic NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase pathway, encoded by the duplicated *GDH1* and *GDH3* genes. Both isoenzymes were purified and characterized, and showed particular properties in their allosteric behavior towards  $\alpha$ -ketoglutarate, together with other biochemical differences. Moreover, it was found that expression of these genes is differentially regulated; the relative presence of these proteins in the cell is controlled by the carbon source in the culture medium. Finally, the physiological characterization of those mutants that lack one of the isoforms suggests that each gene has a particular function that cannot be replaced by the corresponding homologue. Taken together, the results from this study indicate that the conservation and functional diversification of *GDH1* and *GDH3* is the result of the specialization of the pathway to facultative metabolism, as Gdh1p catalyzes glutamate biosynthesis during fermentative growth, while the presence of Gdh3p under respiratory conditions modulates the use of  $\alpha$ -ketoglutarate without compromising the energy-yielding pathways. The phenomenon herein described could be part of the general remodeling that had to take place in the adaptation to facultative anaerobic metabolism. Consequently, other cases of functional diversification are discussed, considering those genes that have been conserved in two copies since the duplication of the entire *S. cerevisiae* genome.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Duplicación de genes y redundancia génica

#### *Duplicación génica y genómica*

El genoma de un organismo puede aumentar su número de genes por dos medios: adquiriéndolos directamente de otras especies, lo que se conoce como transferencia horizontal, o a partir de la duplicación de genes preexistentes. La relevancia de la duplicación génica para el incremento de genes durante la evolución de los genomas fue destacada por Ohno (1970), y hoy se sabe que los genes parálogos son componentes comunes de todos los genomas. La proliferación de ciertas familias multigénicas puede resultar en la innovación funcional de los genes duplicados que las componen (Henikoff *et al.*, 1997). Por lo anterior, los genes parálogos tienen que ver con el aumento en la complejidad estructural y funcional de los genomas.

La duplicación de un gen o grupo de genes puede ocurrir por mecanismos moleculares tales como el entrecruzamiento no equivalente, el patinaje en la replicación del DNA o la amplificación génica (Romero y Palacios, 1997; Brown, 1999). Por su parte, la duplicación completa de un genoma puede darse mediante una meiosis aberrante que genera gametos diploides, mismos que al fusionarse resultan en una progenie autoploide o aloploide (Brown, 1999; Friedman y Hughes, 2001).

Se entiende que una duplicación genómica representa el aumento abrupto en el número de genes, el cual puede tener repercusiones en la estructura y la función genética. El aumento en el número de genes se ha relacionado con transiciones importantes entre grupos de organismos, por ejemplo entre invertebrados y vertebrados (Bird, 1995), y se ha propuesto que la causa de dicho incremento génico se debe a una o más duplicaciones genómicas (Ohno, 1970; Sidow, 1996). Aún cuando existe controversia acerca de la contribución relativa de la duplicación genómica con respecto a la duplicación de genes individuales (Hughes, 1999; Sankoff, 2001), hay suficiente evidencia molecular para afirmar que la estructura actual de algunos genomas eucariontes es el resultado de uno o más eventos de duplicación genómica, como una duplicación reciente en *Saccharomyces cerevisiae* y dos eventos independientes en el caso de *Arabidopsis thaliana* (Wolfe, 2001).

La duplicación genera redundancia; se habla de redundancia estructural cuando en un mismo genoma se encuentran dos o más genes parálogos con un alto porcentaje de identidad en la secuencia deducida de aminoácidos (Friedman y Hughes, 2001). La redundancia estructural es una característica sobresaliente de todos los seres vivos, particularmente de los organismos eucariontes. Al menos una cuarta parte de los genes de un genoma eucarionte son miembros de familias multigénicas (Rubin *et al.*, 2000). En el **Cuadro 1** se presenta la proporción de genes redundantes calculados en algunos genomas secuenciados.

### *Conservación de genes redundantes*

En principio, los genes resultantes de un evento de duplicación tienen la misma función, su destino será la retención en doble copia o la pérdida de una de ellas. Tradicionalmente se ha pensado que sólo son conservados aquellos genes duplicados que divergen en función, evitándose por selección natural que uno de los homólogos se pierda por la acumulación de mutaciones puntuales (Ohno, 1970). Contrario a esto, existen ciertos genes redundantes o con funciones traslapadas que han sido conservados: La inactivación experimental de un gen redundante puede no resultar en un fenotipo observable, debido a que la presencia del parálogo suple la falta de éste (Brookfield, 1997; Nowak *et al.*, 1997).

Estos casos plantean un problema evolutivo que bien vale la pena estudiar. En este contexto, se han planteado varias hipótesis que intentan explicar el porqué ciertos genes con funciones redundantes o traslapadas tienden a ser conservados después de una duplicación:

i) Las mutaciones degenerativas en un gen multifuncional provocan que haya una separación de funciones en las copias duplicadas, por lo que ambas son conservadas para satisfacer la función original (Wagner, 2000); casos como el de los genes que se expresan en diferentes tejidos, o el de las enzimas con múltiples sustratos.

ii) Las mutaciones degenerativas provocan que ninguna de las copias génicas por sí sola genere suficiente producto, por lo que ambas son conservadas (Lynch y Force, 2000).

iii) Ciertos genes pueden encontrarse bajo la presión selectiva por un incremento en su expresión. La duplicación facilita lo anterior mediante un aumento en la dosis génica, de ahí que se conserven dos copias funcionalmente redundantes (Seoighe y Wolfe, 1999a).

iv) Las mutaciones puntuales en ciertos genes con dominios múltiples son dominantes y provocan fenotipos letales. Por tanto, ambas copias tienden a conservarse pese a ser redundantes en función (Gibson y Spring, 1998).

## 2. La levadura *Saccharomyces cerevisiae*

### *Un modelo para el estudio de la célula eucarionte*

Durante más de cien años, la levadura *S. cerevisiae* ha sido utilizada como modelo para diversos estudios bioquímicos y genéticos que la han convertido en el organismo eucarionte más conocido. Las células de levadura están organizadas de manera muy similar a las células de organismos multicelulares más complejos, y muchas de las proteínas codificadas en su genoma están relacionadas en estructura y función con sus homólogos en mamíferos (Watson *et al.*, 1992). Sin embargo, hay ciertos aspectos de su biología que hacen el trabajo de investigación casi tan fácil como aquel con células bacterianas (Sherman, 1991): Se trata de un microorganismo no patogénico que crece rápidamente en medios de cultivo simples y sus células pueden ser mantenidas de manera controlada en el estado sexual haploide o diploide, por lo que son especialmente útiles para el análisis genético. Otras ventajas son la posibilidad de aislar mutantes o la facilidad con la que se puede transformar genéticamente. Además, el genoma de la levadura es muy pequeño si se compara con otros organismos eucariontes: sólo unas tres veces mayor que el genoma de un organismo procarionte como *Escherichia coli*, pero 200 veces más pequeño que un típico genoma de mamífero.

### *El genoma de *S. cerevisiae**

Con la secuencia completa del genoma de la levadura se conoció por primera vez la estructura genómica de un eucarionte (Goffeau *et al.*, 1996; Dujon, 1996; Mewes *et al.*, 1997). La levadura haploide tiene un genoma de 13,478 kb, contenidas en 16 cromosomas de tamaños que oscilan entre 230 y 2,350 kb, y en un DNA mitocondrial de 86 kb. El genoma nuclear es muy compacto, debido a que las regiones intergénicas son pequeñas y existen pocos intrones. En promedio, las regiones entre los ORFs divergentes son de 618 nt, y de tan sólo 326 nt para aquellos que convergen. Tres cuartas partes del DNA

cromosómico corresponde a secuencias codificantes y sólo el 3.8% de los ORFs contiene intrones (**Cuadro 2**).

A partir del conocimiento de la secuencia completa de este genoma, *S. cerevisiae* se convirtió en el organismo modelo para las ciencias genómicas en eucariontes, especialmente en lo que respecta al análisis genómico funcional (Kumar y Snyder, 2001). A la fecha, se han caracterizado experimentalmente poco más del 60% de los ORFs identificados (**Figura 1**).

Recientemente se han secuenciado parcialmente los genomas de 13 levaduras filogenéticamente cercanas a *S. cerevisiae*, todas de la clase Hemiascomycetes (Souciet *et al.*, 2000). Dicho proyecto ha permitido la identificación de algunos mecanismos moleculares en la evolución de los genomas eucariontes, y ha llevado a la conclusión de que la especiación puede ocurrir mediante una reorganización discreta y limitada de un repertorio génico preexistente. Además, la identificación de cerca de 20,000 ORFs antes desconocidos ha permitido determinar genes específicos de ascomicetos, revisar la distribución de genes en diferentes categorías funcionales y reanalizar la secuencia completa del genoma de *S. cerevisiae* (Blandin *et al.*, 2000).

#### *Las regiones duplicadas en el genoma de S. cerevisiae*

Una característica relevante de *S. cerevisiae* es la elevada proporción de genes estructuralmente redundantes. A partir de la secuencia completa de este genoma, Wolfe y Shields (1997) reportaron la presencia de 55 bloques cromosómicos duplicados. Por la conservación del orden y de la orientación de los genes que los conforman, dichos bloques son la evidencia de que esta levadura es un organismo tetraploide degenerado, resultado de una duplicación genómica ancestral. El evento debió haber ocurrido hace alrededor de 100 millones de años, debido a los patrones de divergencia de los genes duplicados con respecto a sus homólogos en otras levaduras como *Kluyveromyces lactis* (**Figura 2**). La mayor parte de las duplicaciones se han perdido, pues como resultado del evento de duplicación genómica, sólo se han conservado en doble copia el 16% de los genes del genoma actual de *S. cerevisiae* (Keogh *et al.*, 1998). Los pares conservados presentan altas identidades en sus secuencias de aminoácidos, que en la mayoría de los casos caen en un intervalo que va del 65% al 98% (Seoighe y Wolfe, 1999b).

El modelo, tal como se presenta en la **Figura 2**, implica que la redundancia génica es exclusiva de aquellas especies que divergieron después del evento de duplicación genómica ancestral. Contrario a lo anterior, se sabe que a lo largo de todo el linaje de los hemiascomicetos existen proporciones de genes redundantes similares a las observadas en *S. cerevisiae*. La duplicación y pérdida de genes o fragmentos cromosómicos individuales parece ser un evento común y frecuente durante la evolución de los genomas eucariontes en general (Llorente *et al.*, 2000), por lo que es necesario tener en cuenta que una duplicación genómica no es un requisito indispensable para la existencia de bloques o grupos de genes redundantes (Llorente *et al.*, 2000; Friedman y Hughes, 2001).

### *Metabolismo y fisiología de S. cerevisiae*

*S. cerevisiae* es un organismo anaerobio facultativo que es capaz de proliferar tanto en condiciones anaerobias como aerobias. Para ello puede usar toda una serie de carbohidratos (monosacáridos, disacáridos y oligosacáridos) y otras fuentes de carbono como etanol, acetato, piruvato y lactato. La fuente de carbono preferida es la glucosa; el catabolismo de este compuesto ocurre de manera fermentativa a través de la vía Embden-Meyerhof, que resulta en la formación de etanol (Dickinson, 1999a). En presencia de glucosa, y de manera independiente de la concentración de oxígeno, la síntesis de las enzimas necesarias para metabolizar fuentes alternativas de carbono se encuentra reprimida. Lo mismo ocurre con las enzimas requeridas para la función respiratoria y con las proteínas que participan en la biogénesis mitocondrial. Por lo anterior, durante el crecimiento aerobio o anaerobio en glucosa, la mayoría del ATP es sintetizado a partir de las fosforilaciones a nivel de sustrato de la glucólisis (Fraenkel, 1982). Cuando la glucosa es consumida y su concentración en el medio disminuye, ocurre una inducción de la expresión de los genes que permiten la función respiratoria y, si hay oxígeno en el medio, la célula puede consumir fuentes no fermentables como el etanol (Forsburg y Guarente, 1989). Así, durante el crecimiento respiratorio en fuentes de carbono no fermentables, la síntesis de ATP depende de la fosforilación oxidativa mitocondrial.

Para *S. cerevisiae*, todos los aminoácidos pueden funcionar como única fuente de nitrógeno, aunque no todos permiten la misma velocidad de crecimiento. El catión amonio es preferido sobre cualquier aminoácido, su presencia provoca la represión de las enzimas responsables del catabolismo de aminoácidos. El glutamato, la glutamina y la asparagina también causan la represión de las enzimas implicadas en la utilización de otros



aminoácidos (Cooper, 1982). Una disminución en la concentración intracelular de cualquier aminoácido causa la activación general de los genes que codifican para un grupo numeroso de enzimas responsables de la biosíntesis de aminoácidos (Hinnebusch, 1992).

### 3. Las glutamato deshidrogenasas

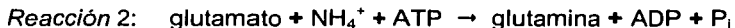
#### *Asimilación de amonio y biosíntesis de glutamato*

Los microorganismos de vida libre poseen vías metabólicas que les permiten sintetizar todos los aminoácidos a partir de nitrógeno inorgánico. El amonio es asimilado en los aminoácidos glutamato y glutamina, los cuales donan sus grupos amino y amido, respectivamente, para la síntesis de otros aminoácidos, así como purinas, pirimidinas y demás moléculas nitrogenadas. En la mayoría de los microorganismos, alrededor del 88% del nitrógeno celular proviene del grupo amino del glutamato, mientras que el resto se deriva del grupo amido de la glutamina (Reitzer y Magasanik, 1987). Visto así, la síntesis y catabolismo de glutamato y glutamina constituyen la parte central del metabolismo del nitrógeno.

Existen dos vías para la asimilación de amonio. En una de ellas, la glutamato deshidrogenasa (GDH, Reacción 1) cataliza de manera reversible la biosíntesis de glutamato a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato y amonio.



La presencia de una ruta alternativa para la biosíntesis de glutamato fue detectada por primera vez en *Klebsiella aerogenes* por Tempest *et al.* (1970). Esta vía comprende un ciclo formado por las enzimas glutamino sintetasa (GS, Reacción 2) y glutamato sintasa (GOGAT, Reacción 3). La glutamina es sintetizada a partir de glutamato y amonio, mientras que la enzima GOGAT cataliza la aminación reductiva del  $\alpha$ -cetoglutarato a partir del grupo amido de la glutamina, produciendo dos moléculas de glutamato.



En bacterias entéricas, la vía GDH parece ser utilizada en condiciones de exceso de amonio o cuando existe una limitación de energía, mientras que la función principal del ciclo

GS/GOGAT es la biosíntesis de glutamato bajo condiciones de limitación de amonio (Helling, 1994). En el hongo *Neurospora crassa*, el ciclo GS/GOGAT juega un papel importante en la degradación de la glutamina, función que la GDH no puede sustituir (Mora, 1990). Estas particularidades funcionales, así como la presencia de ambas rutas en una gran variedad de organismos, confirman la relevancia fisiológica de dos vías que participan en la asimilación de amonio (Merrick y Edwards, 1995). La GDH y el ciclo GS/GOGAT son vías que juegan un papel central como punto de conexión entre los metabolismos del nitrógeno y del carbono (**Figura 3**). En el caso de *S. cerevisiae*, el ciclo GS/GOGAT constituye una vía auxiliar para la biosíntesis de glutamato (Valenzuela *et al.*, 1998), y se ha especulado que bajo ciertas condiciones podría además participar en el control de las concentraciones de dinucleótidos (van Riel *et al.*, 1998).

### *Las diferentes clases de GDHs*

Las GDHs son enzimas ampliamente distribuidas en todos los grupos filogenéticos (Hudson y Daniel, 1993), que catalizan la desaminación oxidativa reversible del glutamato para formar  $\alpha$ -cetoglutarato y amonio, como se mencionó anteriormente. Las GDHs, junto con las aminotransferasas, son enzimas que participan en la redistribución de grupos amino en la célula, jugando un papel central en los flujos de intermediarios entre diferentes vías anabólicas y catabólicas (Reitzer y Magasanik, 1987).

En procariontes, protistas y hongos, las GDHs descritas son específicas para  $\text{NAD}^+$  (EC 1.4.1.2) o para  $\text{NADP}^+$  (EC 1.4.1.4) (Holzer y Schneider, 1957), mientras que aquellas presentes en vertebrados pueden actuar con ambos cofactores (EC 1.4.1.3). En términos generales, las  $\text{NAD-GDHs}$  son responsables del catabolismo de glutamato, mientras que las  $\text{NADP-GDHs}$  son enzimas anabólicas que participan en la asimilación de amonio (Smith, 1975).

Todas las GDHs reportadas a la fecha son enzimas multiméricas que constituyen una familia dentro de la superfamilia de las deshidrogenasas de aminoácidos que parece haber evolucionado por duplicación génica y especialización en diferentes sustratos (Britton *et al.*, 1993). Con base en el tamaño de las subunidades y su composición monomérica, la familia de las GDHs se puede dividir en dos subfamilias o grupos estructurales (Britton *et al.*, 1992; Miñambres *et al.*, 2000):  $\text{S\_GDHs}$ , hexámeros con subunidades de ~50 kDa; y

L\_GDHs, tetrámeros con subunidades de ~115 kDa o hexámeros con subunidades de ~180 kDa.

La subfamilia de las S\_GDHs comprende las NAD-GDHs, NADP-GDHs o NAD(P)-GDHs presentes en todos los grupos filogenéticos. Su evolución es destacable, porque en el grupo existen dos subclases que parecen ser resultado de la presencia de dos parálogos en el último ancestro de los tres dominios universales (eubacterias, arqueobacterias y eucariontes), o bien a un evento de transferencia horizontal muy antiguo (Benachenhou-Lahfa, 1993). La primera subclase está formada por las S\_GDHs de eubacterias, hongos y animales, mientras que la segunda corresponde a las proteínas de plantas y arqueobacterias.

Por otra parte, las L\_GDHs son NAD-GDHs catabólicas que se habían considerado exclusivas de hongos y protistas, aunque recientemente se ha encontrado una L\_GDH hexamérica dependiente de AMP en *Streptomyces clavuligerus* (Miñambres et al., 2000).

#### *Estructura tridimensional de la GDH*

Actualmente se conoce por cristalografía de rayos X la estructura tridimensional de varias S\_GDHs; la primera en haber sido resuelta es la de *Clostridium symbiosum* (Baker et al., 1992) (**Figura 4**). La forma oligomérica de esta proteína es el hexámero, que se encuentra organizado en forma de un dímero de trímeros. La estructura tridimensional de las GDHs de organismos hipertermófilos como *Pyrococcus furiosus* (Yip et al., 1995) y *Thermococcus litoralis* (Britton et al., 1999) también se ha resuelto, lo cual ha ayudado a entender la estabilidad de proteínas a temperaturas extremas. Además, se conoce la estructura de la GDH de hígado bovino (Peterson et al., 1997), una enzima que ha sido intensamente estudiada por su comportamiento alostérico complejo que la diferencia de aquellas de bacterias o de hongos.

#### *Las isoenzimas NADP-GDH de S. cerevisiae*

La NADP-GDH codificada por *GDH1* es la vía principal para la biosíntesis de glutamato en *S. cerevisiae* (Drillien y Lacroute, 1972; Grenson et al., 1974). Sin embargo, una doble mutante interrumpida en los genes *GDH1* y *GLT1* es capaz de crecer en amonio como única fuente de nitrógeno, debido a la presencia de una isoenzima NADP-GDH codificada

por *GDH3* (Avendaño *et al.*, 1997). Las proteínas codificadas por los genes *GDH1* y *GDH3* son miembros de la familia S\_GDH, y presentan un 87% de identidad y un 93% de similitud. La **Figura 5** muestra el alineamiento de las secuencias deducidas de aminoácidos con su homólogo en *C. symbiosum*, cuya estructura tridimensional es conocida. Las diferencias entre las isoenzimas de levadura que más llaman la atención aparecen en el asa que se encuentra entre las hélices  $\alpha_{16}$  y  $\alpha_{17}$  correspondientes en *C. symbiosum*; dicha asa forma parte de la interfase entre los dominios I y II del monómero. También se observan sustituciones acumuladas en el extremo N-terminal previo a la hélice  $\alpha_5$  correspondiente, así como varias sustituciones en toda la región que va de la hélice  $\alpha_{11}$  a la hoja  $\beta_m$ , que forma parte del dominio de unión al NADPH.

**Cuadro 1.** Proporción de genes redundantes presentes en los genomas de diferentes organismos.

	Número de genes que codifican proteínas	Número de familias diferentes <sup>a</sup>	Proporción de genes únicos <sup>b</sup>	Proporción de genes redundantes <sup>c</sup>
			%	%
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,709	1,587	88.8	11.2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5,786	5,105	71.4	28.6
<i>Drosophila melanogaster</i>	12,860	10,736	72.5	27.5
<i>Caenorhabditis elegans</i>	18,890	14,177	55.2	44.8
<i>Arabidopsis thaliana</i>	25,498	11,601	35.0	65.0

El criterio de este análisis es estricto, pues sólo se consideran como miembros de una misma familia (genes redundantes) aquellos genes que muestran entre sí una identidad con valor BLASTp de  $E < 10^{-20}$  y un alineamiento de al menos el 80% de la secuencia. Tomado de *The Arabidopsis Genome Initiative* (2000).

<sup>a</sup> Número total de familias con uno o más miembros.

<sup>b</sup> Porcentaje de familias con un solo miembro.

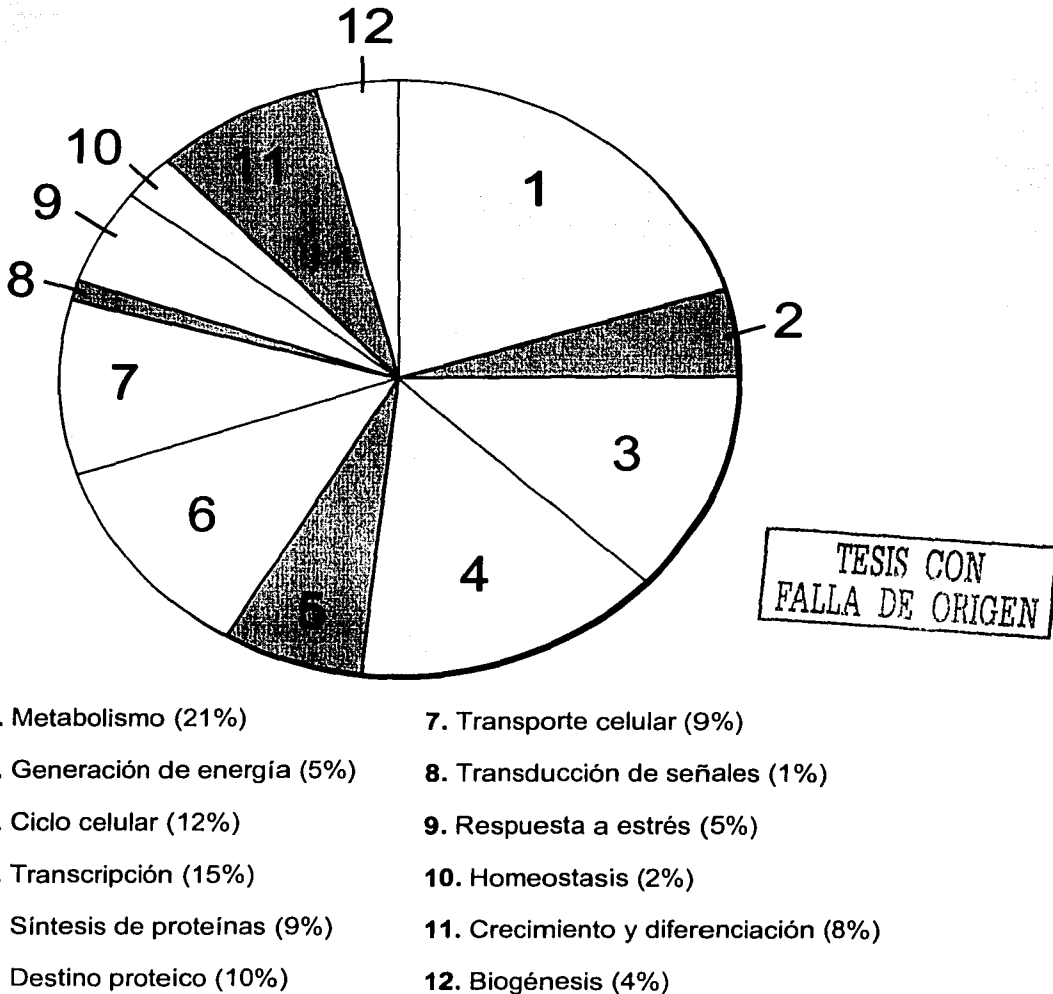
<sup>c</sup> Porcentaje de familias con dos o más miembros.

**Cuadro 2.** Estructura del genoma de *S. cerevisiae* descrita en sus elementos genéticos.

	Número de elementos	Densidad	Tamaño promedio	Contribución al genoma
		<i>kb/elemento</i>	<i>kb</i>	%
<b>Elementos que codifican proteínas</b>				
ORFs	6,368	2.0	1.45	68.0
Proteínas hipotéticas	5,929	2.1	1.45	63.8
Intrones	233	52	0.50	0.88
<b>Elementos que codifican RNA</b>				
Repeticiones DNAr	120 – 130	-	9.00	8.5
Genes de RNAt	262	46	0.08	0.16
Intrones en genes de RNAt	80	-	0.02	0.01
RNA <sub>sn</sub>	37	326	0.50	0.14
<b>Elementos móviles</b>				
Transposones completos (Ty)	53	-	5.60	2.3
<b>Elementos cromosómicos</b>				
Secuencias de replicación autónoma	750	16	0.02	0.11
Centrómeros	16	-	0.09	0.01
Elementos subteloméricos	52	-	5.80	0.92
Repeticiones teloméricas	32	-	0.30	0.07
<b>Regiones intergénicas</b>				
Promotores, terminadores y otras secuencias	-	-	0.50	22.1

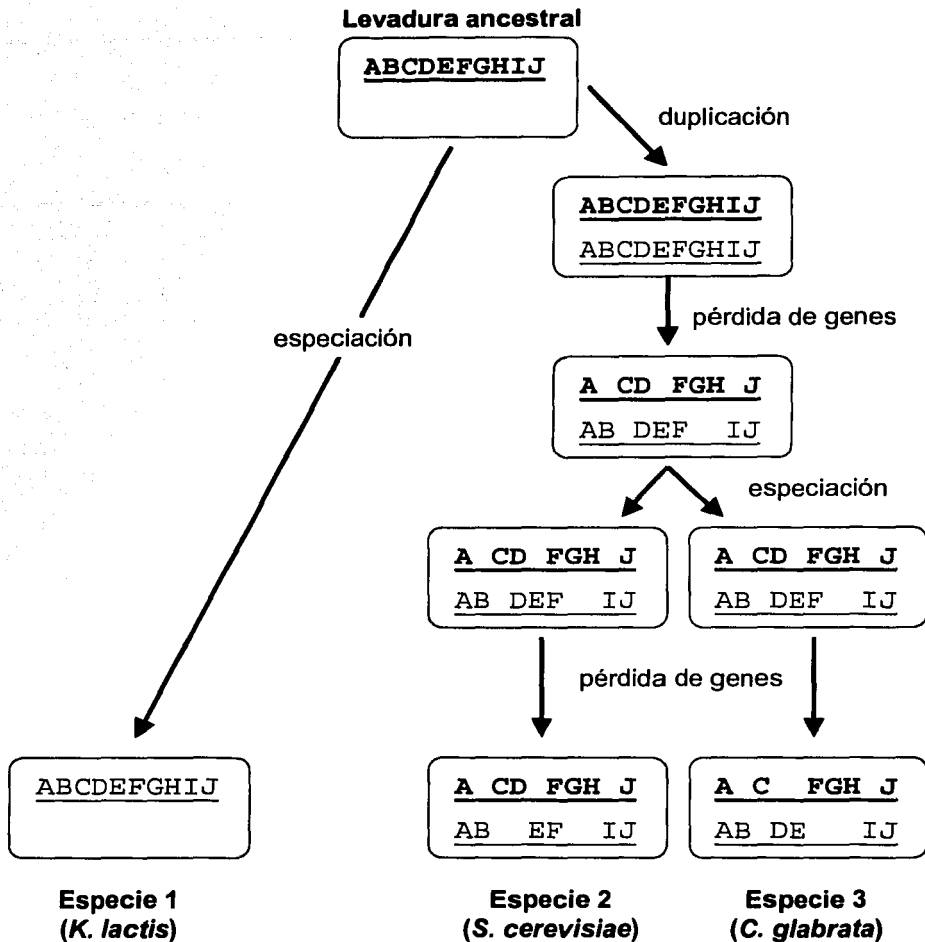
Los datos fueron tomados de Dujon (1996).

Figura 1



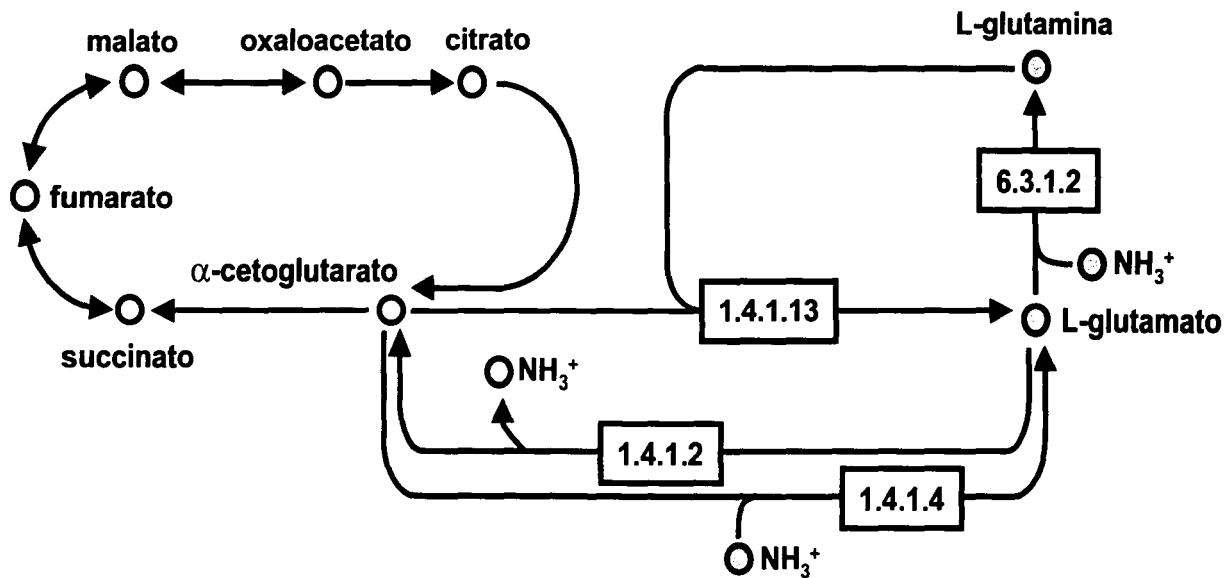
**Figura 1. Clasificación de los genes de *S. cerevisiae* según su función celular.** De los 6,450 ORFs identificados en este genoma, 3,936 se han caracterizado experimentalmente o por homología. Es esta fracción (61% del genoma) la que se considera en el catálogo funcional. Los datos fueron tomados de la base de datos del *Munich Information Center for Protein Sequences* (MIPS, <http://www.mips.biochem.mpg.de>) actualizada en enero de 2002.

Figura 2



**Figura 2. Organización actual del genoma de *S. cerevisiae*, considerando un evento de duplicación ancestral.** La especie 1 diverge de las especies 2 y 3 antes del evento de duplicación genómica; así lo sugiere la comparación de genes duplicados en *S. cerevisiae* con sus ortólogos en *K. lactis*. Por otra parte, se predice que las especies 2 y 3 comparten algunas de las duplicaciones, ya que divergieron después del evento de duplicación genómica, pero presentan pérdidas específicas por un proceso de resolución divergente durante la especiación. Aunque no se cuenta con suficientes datos de su secuencia genómica, *Candida glabrata* parece descender del mismo evento de duplicación que *S. cerevisiae*, de acuerdo con el número de cromosomas y el orden de los genes hasta ahora identificados. El esquema fue tomado de Seoighe y Wolfe (1999a).

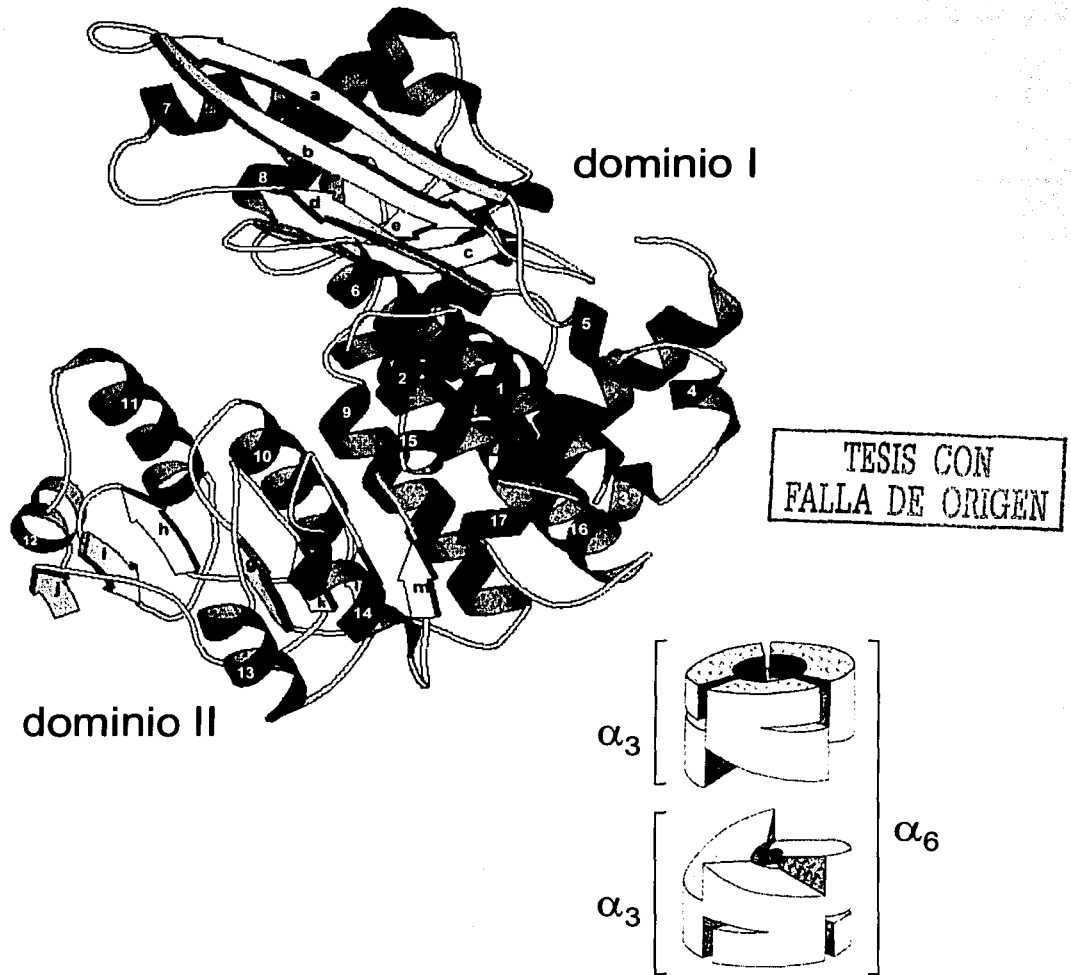




**Figura 3. Metabolismo central del nitrógeno en *S. cerevisiae*.** Las vías de asimilación de amonio y de biosíntesis de glutamato y glutamina constituyen el metabolismo central del nitrógeno. El  $\alpha$ -cetoglutarato juega un papel como punto de conexión con el metabolismo del carbono. En *S. cerevisiae*, las enzimas y los genes que las codifican corresponden a: 1.4.1.4, NADP-GDH (*GDH1* y *GDH3*); 1.4.1.2, NAD-GDH (*GDH2*); 6.3.1.2, GS (*GLN1*); 1.4.1.13, GOGAT (*GLT1*).

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Figura 4



**Figura 4. Estructura tridimensional de la GDH de *C. symbiosum*.** El polipéptido que constituye cada monómero está plegado en forma de dos dominios separados por una cavidad profunda. El dominio I dirige el ensamblaje oligomérico de la molécula. El dominio II presenta el plegamiento clásico de proteínas de unión a dinucleótidos. Las  $\alpha$ -hélices están numeradas del 1 al 17 siguiendo la dirección de la cadena peptídica, mientras que las hojas- $\beta$  se nombran de la a a la m. En la parte inferior se muestra el ensamblaje de las subunidades en forma de un dímero de trímeros.

Figura 5

		a1	a2	a3	a4	a5	
C. sym		---SKYVDRVIAEVEKKYADEPEFVQTEVEVLSLGP--VVDHPEVEVEALLERMIPE				55	
E. coli1		MDOQTSLESFLNHVQKRDPNQTEFAQAVREVMITLWP--FLEQNPKYRQMSLLERLVEPE				58	
Psych.		----MSISKIAIEKVEARYAHQPEFQIQAQVEVAITIKP--LYDAHPEYDKLKVFERLVEPD				54	
Sc. GDH1		-----MSEPEFQQAQYEEVSSLEDSTLFEQHPEYR--KVLPIVSVPE				40	
Sc. GDH3		-----MTSEPEFQQAQYDEIVSSVEDSKIEPEKPPYK--KVLPIVSVPE				41	
		::: * * * * * : : : : : * * * * * : : : : :					
		βa	βb	βc	α6		
C. sym		RVIEFRVPEWEDDNGKVVHNTQYRVQFNQAI GPYKGGRLRFAPSVNL I MKFLGFEQAFKDS			115		
E. coli1		RVIQFRVWVDDRNQIQVNRARWRVQFSSAIGPYKGGMRFPSPVNL I LKFLGFEQTFKNA			118		
Psych.		RVFGFRVNWEDDNGEIQINRGWRVQFNSALGPYKGGRLRFPVTVNQSVLKFLGFEQIFKNA			114		
Sc. GDH1		RI IQFRVTWENDKGEQVAQGYRVQNSAKGPYKGGRLRFPSPVNL I LKFLGFEQIFKNS			100		
Sc. GDH3		RI IQFRVTWENDKGEQVAQGYRVQNSAKGPYKGGRLRFPSPVNL I LKFLGFEQIFKNA			101		
		::: * * * * * : : : : : * * * * * : : : : :					
		βd	α7	βe			
C. sym		LTTLPMGAGKGGSDFPDNGKSDREVMRFCQAFMTELYRHI GPDIDV PAGDLGVGAREIGY			175		
E. coli1		LTTLPMGAGKGGSDFPDNGKSEGEVMRFCQALMTELYRHLGADTDV PAGDIDGVGREGVGF			178		
Psych.		LTGLPIGGGKGGSDFPDNGKTDSEIRRCFYAFMRELHHVYVNMMDV PAGDIDGVGREGVSY			174		
Sc. GDH1		LTGLMGGGKGGKGLVDLKGSRNNEIRRICYAFMRELSRHII QDQTDV PAGDIDGVGREGIY			160		
Sc. GDH3		LTGLMGGGKGGKGLVDLKGSDNEIRRICYAFMRELSRHII QDQTDV PAGDIDGVGREGIY			161		
		::: * * * * * : : : : : * * * * * : : : : :					
		α8	I	II	α9		
C. sym		MYGQYRKIVGGFYNGVLTOKARSPFGS			LVRPEATGYGVSYYVEAVMKHEN--DTLVGKT	232	
E. coli1		MAGMMKLLSN-NTACVFTGKGLSFGGS			LIRPEATGYGLVYTEAMLKRHG--MGFEGMR	234	
Psych.		MFAMYKNLNR-ESTGVI TGRVGFPGS			LMRTEATGYGAVYFLQMLLAQN--ESI EGKK	230	
Sc. GDH1		LFGAYRSYKKN-SWEGVLTGKILNWGGS			LIRPEATGYGLVYVYQAMIDYATNGKESFEGKR	219	
Sc. GDH3		LFGAYRSYKKN-SWEGVLTGKILNWGGS			LIRPEATGGLVYVYQAMIDYATNGKESFEGKR	220	
		::: * * * * * : : : : : * * * * * : : : : :					
		βg	α10	βh	βi	α11	
C. sym		VALAGFCNVANGAAKLAELGAKAVTLSGPDGYIYDPEGITTEEKINYMLEMRA--SGRN				290	
E. coli1		VSVSGSNVAQYAI EKAMEFGARVITASDSSGTVVDESQGT-KEKLARLIEIKAI--SRDC				291	
Psych.		VLVSGAGNVSLHAAEKATLIGAVLTVSDSKGTIYDAKLN-QEKID-WLKVQK--DQHK				286	
Sc. GDH1		VTISGSGNVAQYAAALKVIELGGTVVLSLSDSKGCI ISETGIT-SEQVADISSAKVNFPSLE				278	
Sc. GDH3		VTISGSGNVAQYAAALKVIELGGTVVLSLSDSKGCI ISETGIT-SEQVADISSAKVNFPSLE				279	
		::: * * * * * : : : : : * * * * * : : : : :					
		α12	βj	βk	α13	βl	
C. sym		KVQDYADKFG--VQFFPEKPPW--QKVDIIMPATONDVDLEQAKKIVANNVYKYEIV				345	
E. coli1		RVADYAKEFG--LVYLEGQQPWS--LPVDIALPCATQNELDVDAAHQLIANGVKAVAEG				346	
Psych.		PLADYVEVFG--GEMMADQKPS--IKADIAIPSATQNEINDEDAKLLVDNGVKYIEVG				341	
Sc. GDH1		QIVNEYSTFSENKQYIAGARPWTHVQVDIALPCATQNEVSGEAKALVAQVKVFAEG				338	
Sc. GDH3		QIVNEYSTFSEKQYVAGARPWTHVQVDIALPCATQNEVSGEAKALVAQVKVFAEG				339	
		::: * * * * * : : : : : * * * * * : : : : :					
		α14	βm	II	α15		
C. sym		ANMPTTNEALRFLMQQP-----MVVAFSKAVNAGGVLSVGFEMSQNSERLSWTAE				397	
E. coli1		ANMPTTIEAT-ELFQQAQ-----VLFAPSKAANAGGVAVTSGFEMSQNAARLGHKAEK				397	
Psych.		ANMPLTAEAI DYIRLHR-----VHYAFSKAANAGGVAVSALEMSQNSVROYQTFPE				392	
Sc. GDH1		SNMGSTPEA I V FETARSTATGPSEAVWYGF			PKAANLGGVAVSGLEMAQNSOR I TWTSER	398	
Sc. GDH3		ANMGSTPEA I V FETARSTATNAKDVAWYGF			PKAANLGGVAVSGLEMAQNSOR I TWTSER	399	
		::: * * * * * : : : : : * * * * * : : : : :					
		α16	I	α17			
C. sym		VDSKILHQVMTDIHDSAAAERYGLQYN-----LVAGANIVGFQKIADAMMAQGI AW				449	
E. coli1		V DARLHHIMLDIHHACVEHGGEGEQTN-----VVOGANIAGFVKVADAMLAGGVI-				447	
Psych.		VDERLQIMKDIHDSAAQASEMYGQTDGEYID-----VMSGANMVGFKRVADALVAFGILN				448	
Sc. GDH1		VQDELKRIMNCFNECIDYAKKYT--KDGKVLPS			LVKGANIASFKVSDAMFDQGGDFV	454	
Sc. GDH3		VQDELKRIMNCFNECIDYAKKYT--KDGKVLPS			LVKGANIASFVADAMFDQGGDFV	457	
		::: * * * * * : : : : : * * * * * : : : : :					

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

**Figura 5. Alineamiento de las secuencias de las NADP-GDHs de *GDH1* y *GDH3* de *S. cerevisiae* con algunas GDHs homólogas. Se muestran los elementos de la estructura secundaria de *C. symbiosum* (Baker *et al.*, 1992). Los corchetes indican los residuos pertenecientes a los dominios I y II de la estructura terciaria del polipéptido. Se subrayan aquellos residuos en los que difieren Gdh1 y Gdh3p, que tienen entre sí una identidad de 87%. La secuencia de *C. symbiosum* comparte un 47% de los aminoácidos con *GDH1* o *GDH3* de levadura. Las secuencias son de la base de datos Swiss-Prot, con números de acceso P24295 (*C. symbiosum*), P00370 (*E. coli*), Q9S1F9 (*Psychrobacter* sp.), P07262 (*GDH1*, *S. cerevisiae*) y P39708 (*GDH3*, *S. cerevisiae*).**

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que alrededor del 16% de los genes del genoma de la levadura *S. cerevisiae* se encuentran en dos copias originadas a partir de un evento de duplicación genómica (Wolfe y Shields, 1997; Keogh *et al.*, 1998), y llama la atención que prácticamente todos estos parálogos no han divergido en función, sino que conservan su función original (Seoighe y Wolfe, 1999a). Así, el significado fisiológico de esta redundancia, si lo hay, no es del todo claro. Autores como Seoighe y Wolfe (1999a) han sugerido que podría haber una tendencia a conservar por duplicado los genes cuya expresión es intensa; otros como Piškur (2001) han sugerido que la existencia de ciertas proteínas por duplicado podría haber facilitado una especialización funcional para las condiciones contrastantes que el metabolismo facultativo exige.

A partir del análisis de la disposición de los genes que forman parte de los bloques cromosómicos duplicados, así como de la divergencia de las secuencias, los genes *GDH1* y *GDH3* parecen ser resultado de la duplicación ancestral del genoma de la levadura (Seoighe y Wolfe, 1999b). A la fecha en que se dio inicio a esta investigación, no había información sobre una posible especialización en la función de las dos isoenzimas NADP-GDH codificadas por estos genes. Este caso de redundancia génica presenta un problema adicional, tomando en cuenta que la vía tiene *per se* una función traslapada con el ciclo GS/GOGAT.

En el presente trabajo se planteó como objetivo, investigar los papeles fisiológicos de *GDH1* y *GDH3*, en busca de posibles diferencias que pudieran explicar la conservación de dos genes que codifican para la misma actividad enzimática. Pese a muchos años de estudio de las vías de asimilación de amonio, la existencia de una isoenzima NADP-GDH había pasado inadvertida dada la represión de *GDH3* por glucosa, la fuente de carbono que se usa en los medios de cultivo más comunes. Este hecho obstaculizó el estudio del papel fisiológico de la vía y de los mecanismos responsables de regular la canalización de  $\alpha$ -cetoglutarato para la biosíntesis de glutamato. Considerando que la redundancia funcional suele ser más aparente que real, se abordó el trabajo experimental en distintos ámbitos: i) las propiedades de las enzimas que estos genes codifican, ii) la expresión de los genes bajo diferentes condiciones fisiológicas, y iii) las características fenotípicas que exhiben las mutantes interrumpidas en *GDH1* y *GDH3*. Para los aspectos fisiológicos del estudio, se

compararon las condiciones de crecimiento fermentativo y respiratorio, tomando en cuenta las propiedades metabólicas facultativas de esta levadura, así como la relevancia de la vía NADP-GDH como punto de conexión entre los metabolismos del carbono y del nitrógeno.

La parte medular de los resultados de este trabajo de investigación se presenta en el ARTÍCULO 1. Los datos indican que las NADP-GDHs de levadura tienen propiedades cinéticas diferentes, y que la expresión relativa de las isoenzimas se ve afectada por la naturaleza de la fuente de carbono y por el estado de la función respiratoria. Además, las mutantes exhiben fenotipos particulares que apuntan a una especialización en la función metabólica de las isoenzimas. A partir de los resultados obtenidos puede proponerse un mecanismo mediante el cual la conservación de dos genes estructuralmente redundantes, pero especializados, facilita la adaptación al metabolismo facultativo. Por lo anterior, se discute la posibilidad de que el caso de las NADP-GDHs sea el reflejo de un mecanismo general de adaptación al metabolismo anaerobio en *S. cerevisiae*, debido a que *GDH1* y *GDH3* forman parte de un conjunto de más de 900 genes redundantes que parecen haber sido originados de manera simultánea después de la divergencia de los linajes de levaduras no facultativas, y que han sido conservados hasta la actualidad.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El objetivo general del presente estudio fue entender el papel fisiológico de la vía NADP-GDH duplicada en *S. cerevisiae*. Para ello, se buscó determinar si las isoenzimas codificadas por *GDH1* y por *GDH3* son redundantes en sus propiedades bioquímicas y su regulación; o si por el contrario, exhiben diferencias que sugieran una especialización funcional.

La estrategia general consistió en:

- 1. Estudiar las propiedades bioquímicas de las proteínas codificadas por *GDH1* y por *GDH3* en *S. cerevisiae*.** Se purificaron las proteínas a partir de cepas *gdh1* $\Delta$  o *gdh3* $\Delta$ . A estas muestras, se les determinó la masa molecular y la forma oligomérica mediante el análisis electroforético y cromatográfico. Posteriormente, las enzimas fueron caracterizadas cinéticamente para sus sustratos e inhibidores, prestando atención a las propiedades alostéricas por  $\alpha$ -cetoglutarato. Adicionalmente, se estudió la estabilidad de las proteínas en experimentos de desnaturalización térmica o química, así como su susceptibilidad a la desamidación espontánea *in vitro*.
- 2. Analizar los patrones de expresión relativa de *GDH1* y *GDH3*, en levaduras crecidas bajo diferentes condiciones fisiológicas dadas por la fuente de carbono.** Se obtuvieron anticuerpos contra la NADP-GDH de levadura. Mediante las inmunoréplicas tipo *Western*, se determinaron entonces las cantidades relativas de Gdh1p y Gdh3p en células de levadura crecidas en medios mínimos y ricos suplementados con glucosa o con etanol. También se estudió la proteólisis de las NADP-GDHs, la cual ocurre *in vivo* tiempo después de la privación de glucosa.
- 3. Caracterizar fenotípicamente a las mutantes crecidas bajo diferentes condiciones fisiológicas.** Se generaron mutantes sencillas *gdh1* $\Delta$  o *gdh3* $\Delta$ , así como una doble mutante. Además, las diferentes cepas fueron transformadas con vectores que expresan los citados genes en multicopia. Con fines de la caracterización fenotípica, se determinaron las velocidades de crecimiento de las mutantes generadas, se cuantificaron sus concentraciones intracelulares de  $\alpha$ -cetoglutarato y se determinaron sus actividades específicas de la NAD-GDH catabólica codificada por *GDH2*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Aspectos bioquímicos: caracterización de las NADP-GDHs

Los estudios previos sobre la NADP-GDH de *S. cerevisiae* (Fourcade, 1969; Camardella *et al.*, 1976) fueron llevados a cabo probablemente sobre una mezcla de isoenzimas, o bien sobre Gdh1p, la NADP-GDH que se expresa en células crecidas en medios de cultivo con glucosa. El presente trabajo de investigación demuestra que las isoenzimas codificadas por *GDH1* y *GDH3*, pese a compartir un 87% de su estructura primaria, difieren en aspectos tales como su afinidad por sustratos, su inhibición por fosfato, su comportamiento alostérico y su estabilidad *in vitro*. Estos resultados son ejemplos de la especialización que puede darse en el ámbito funcional a partir de la duplicación relativamente reciente de una misma actividad enzimática. Por otra parte, el hecho de que las isoenzimas NADP-GDH de levadura sean diferentes en algunas de sus propiedades bioquímicas, las convierte en un buen modelo para emprender estudios comparativos sobre algunos aspectos de la estructura y la función de proteínas.

En el apartado de "Materiales y Métodos" del ARTÍCULO 1 se describen los procedimientos mediante los cuales se llevó a cabo la purificación de las NADP-GDHs de levadura. También se describen en el artículo las características de las cepas y plásmidos utilizados en el trabajo experimental.

#### *Purificación y caracterización electroforética*

Debido a que se partió de los extractos crudos de las mutantes interrumpidas pertinentes, las proteínas purificadas en este trabajo corresponden exclusivamente a homohexámeros Gdh1p o Gdh3p (**Cuadro 3**). Con el fin de determinar la posible formación de enzimas heteroméricas *in vivo*, se purificó adicionalmente la NADP-GDH de una levadura silvestre que expresa ambos genes. Todas las cepas fueron crecidas en un medio mínimo con etanol, condición en la que tanto *GDH1* como *GDH3* se expresan intensamente.

El análisis en geles desnaturizantes mostró una sola banda para las proteínas purificadas de las mutantes. La muestra purificada de la cepa silvestre migra en forma de dos bandas que corresponden a los monómeros de Gdh1p y de Gdh3p (**Figura 6**). A pesar

de que las masas moleculares teóricas de estos polipéptidos son iguales (49.6 kDa), el patrón de migración de las bandas resultó ser diferente, lo cual sugiere una modificación postraduccional de alguna de las proteínas. Un procesamiento N-terminal específico de Gdh3p podría ser responsable de este fenómeno; es esta isoforma la que mostró una masa molecular aparente menor a la esperada. Las proteínas purificadas resultaron estar bloqueadas en su extremo N-terminal, por lo que no fue posible conocer la secuencia de aminoácidos que permitiría llegar a una conclusión sobre este supuesto procesamiento. Es importante tener en cuenta la posibilidad de un procesamiento postraduccional específico para Gdh3p; mientras no se tenga idea sobre la naturaleza de esta modificación, será difícil llegar a conclusiones acerca de las diferencias estructurales que existen entre estas proteínas, y sus posibles implicaciones en la función de las isoenzimas.

#### *Forma oligomérica*

Al igual que en otros organismos, el hexámero es la única forma con actividad de NADP-GDH en la levadura (**Figura 7**). Con base en nuestros resultados, la enzima purificada de una cepa silvestre es una mezcla natural de varias isoformas debidas a la oligomerización aleatoria de las subunidades expresadas por *GDH1* y *GDH3*. El ensamblaje de hexámeros híbridos de GDH ha sido reportado en otros organismos, un ejemplo es *A. thaliana* que tiene dos genes cuyos productos codifican para GDH y se ensamblan *in vivo* en forma de hexámeros híbridos (Melo-Oliveira *et al.*, 1996). La asociación de monómeros de la GDH de *K. aerogenes* con los de *E. coli* resulta en la formación de enzimas heteroméricas, en cepas genéticamente transformadas (Mountain *et al.*, 1995).

Los experimentos de disociación de las subunidades de la enzima de levadura (West *et al.*, 1988), así como la estructura tridimensional de la GDH de *C. symbiosum*, sugieren que los hexámeros se forman por la asociación de dos trímeros. El ensamblaje de oligómeros híbridos que se ha descrito en este trabajo parece ser aleatorio. En el análisis de la enzima silvestre de levadura en geles de proteínas nativas, no se registró un patrón de migración definido e intermedio al de los homómeros de Gdh1p y de Gdh3p (**Figura 5**). Dicho de otra manera, si la construcción de trímeros híbridos fuera imposible, sólo se esperarían tres bandas definidas en la muestra purificada de la cepa silvestre. Por el contrario, se apreció un barrido que sugiere la presencia de un mayor número de isoformas. Por tanto, podría haber un total de siete isoformas (dos homohexámeros y cinco heterohexámeros) que se ensamblarían según la proporción relativa de cada monómero, en



cualquier condición en la que *GDH1* y *GDH3* se expresen de manera simultánea. De hecho, en *A. thaliana* se observan siete isoformas de GDHs heteroméricas *in vivo* (Melo-Oliveira et al., 1996).

Los homómeros de Gdh1p son la población mayoritaria en las células de *S. cerevisiae* que crecen en medios de cultivo con glucosa, donde la expresión de *GDH3* se encuentra reprimida. En condiciones con diferentes fuentes de carbono puede asumirse que se ensamblarán distintos hexámeros, según la expresión relativa de *GDH1* y *GDH3*.

#### *Propiedades cinéticas generales*

Las diferencias en las propiedades cinéticas observadas *in vitro* pueden reflejar una forma particular —no redundante— de llevar a cabo la misma actividad catalítica *in vivo*. El estudio cinético comparativo presentado en este trabajo fue llevado a cabo sobre las dos isoenzimas homoméricas codificadas por *GDH1* y *GDH3*. Los valores de  $V_{max}$  fueron similares para ambas isoenzimas en todos los ensayos realizados en la dirección de la biosíntesis de glutamato ( $130 - 150 \text{ U mg}^{-1}$ ). La actividad enzimática en esta dirección mostró una respuesta hiperbólica al incremento en las concentraciones de todos los sustratos, a excepción del  $\alpha$ -cetoglutarato: el aumento en la concentración de este compuesto tuvo un efecto sigmoidal. Todos los sustratos inhibieron la actividad enzimática a partir de cierta concentración; los trazos cinéticos que se muestran en la **Figura 8** consideran en cada caso la concentración de sustrato más alta que no generó este efecto inhibitorio.

En el **Cuadro 4** se resumen los parámetros cinéticos de ambas isoenzimas. La afinidad de Gdh1p por NADPH en términos de  $K_m$  fue ligeramente mayor que la de Gdh3p, mientras que las afinidades por amonio fueron prácticamente iguales. En el sentido contrario de la reacción (desaminación oxidativa), tampoco se encontraron diferencias considerables; la baja afinidad por glutamato y la baja capacidad catalítica sugieren que ninguna de las enzimas tiene un papel fisiológico en la dirección oxidativa de la catálisis. Las diferencias más notables entre las isoformas homoméricas se encontraron en la cinética por  $\alpha$ -cetoglutarato. En términos de  $S_{0.5}$ , Gdh1p mostró una afinidad aparente de entre 4 y 6 veces mayor que Gdh3p, según la condición del pH de la solución (**Cuadro 5**). Mientras que los valores de  $S_{0.5}$  y  $n_H$  se mantienen constantes para Gdh1p ante los cambios

en el pH, el trazo sigmoidal de Gdh3p se vuelve más pronunciado y su afinidad aparente por  $\alpha$ -cetoglutarato disminuye.

Por otra parte, las isoenzimas NADP-GDH de *S. cerevisiae* mostraron ser susceptibles a una inhibición por fosfato inorgánico (**Figura 9**). El efecto de este compuesto ha sido previamente descrito como una inhibición competitiva en la unión del NADPH a la enzima (Venard *et al.*, 1975). Hay que destacar entonces que las isoenzimas mostraron ser diferentes en su respuesta a la inhibición por fosfato: Gdh3p mostró una afinidad 7.8 veces mayor por el inhibidor competitivo en términos de  $K_i$ . De hecho, durante el proceso de purificación, la unión de Gdh3p a la resina de afinidad por NADPH no fue posible en presencia de un amortiguador de fosfatos. Considerando que la unión de Gdh1p a la resina ocurrió bajo las mismas condiciones, esto parece ser el reflejo de las diferencias en la afinidad por el inhibidor. Los estudios sobre el llamado efecto fosfato (Venard *et al.*, 1975) han sido desarrollados, probablemente, sobre esta última isoforma. El haber encontrado una GDH de levadura más sensible al mencionado efecto abre la posibilidad de estudios comparativos de dos isoenzimas que difieren en su unión a fosfato inorgánico en el sitio de unión al cofactor. En la enzima de *C. symbiosum*, la región del dominio II formada por los residuos 203 – 262 es responsable de la mayor parte de las interacciones con el dinucleótido. La secuencia correspondiente en *GDH3* exhibe una sustitución Y196F que sólo se observa en esta proteína (**Figura 5**). Visto así, se puede especular que la falta del grupo hidroxilo en el residuo de fenilalanina de Gdh3p podría ser responsable del marcado efecto inhibitorio del fosfato que, hasta donde se sabe, sólo atañe a esta isoforma de levadura.

También se probó el efecto de varios compuestos sobre la actividad enzimática de las proteínas purificadas (**Cuadro 6**). El citrato, el malato, el fumarato y el glioxalato tuvieron un efecto inhibitorio sobre la actividad de ambas isoformas de levadura. El efecto del glioxalato sobre la NADP-GDH ha sido previamente registrado *in vivo*, y se ha propuesto que este compuesto tiene un papel en la regulación coordinada de la asimilación de amonio y el catabolismo del  $\alpha$ -cetoglutarato (González *et al.*, 1987). En cuanto a la fuerte inhibición por parte de algunos intermediarios del ciclo del citrato, será necesario llevar a cabo estudios fisiológicos para determinar si ésta tiene algún significado regulatorio.

### Comportamiento alostérico

El hecho de que la sigmoidicidad de Gdh3p en términos de  $n_H$  sea una función directa del pH es la evidencia del comportamiento alostérico de la enzima codificada por *GDH3* (**Figura 10**). Dado que otras GDHs hexaméricas son enzimas alostéricas moduladas por diversos efectores (Lascu *et al.*, 1977; Miñambres *et al.*, 2000), se probó la acción de una serie de compuestos sobre la actividad de las isoenzimas de levadura y se encontró que ninguno de éstos tuvo un efecto activador a concentraciones de  $\alpha$ -cetoglutarato cercanas al valor de  $S_{0.5}$  (**Cuadro 6**). No se puede concluir por tanto que entre tales compuestos exista algún activador alostérico de las NADP-GDHs de levadura.

Los hexámeros formados con monómeros de Gdh3p exhiben un comportamiento cooperativo marcado, a diferencia de aquellos formados exclusivamente por subunidades de Gdh1p. Como se mencionó con anterioridad, la enzima purificada de una cepa silvestre es una mezcla de diferentes hexámeros híbridos. Con el fin de estudiar las propiedades alostéricas de esta muestra silvestre, se comparó su comportamiento cinético con aquel de las enzimas homoméricas  $\alpha_6$ Gdh1p y  $\alpha_6$ Gdh3p (**Figura 11**). El trazo sigmoide de la enzima silvestre fue similar al de una combinación artificial de homohexámeros en la misma proporción de monómeros que tiene la muestra silvestre (75% y 25% de  $\alpha_6$ Gdh1p y  $\alpha_6$ Gdh3p, respectivamente). Esto sugiere que las propiedades alostéricas *in vitro* dependen de la presencia relativa de las diferentes subunidades, independientemente de su asociación heteromérica. Con esto se puede asumir que el comportamiento alostérico de la NADP-GDH de levadura dependerá de la proporción que exista entre los monómeros codificados por *GDH1* y *GDH3*.

La GDH de hígado bovino es una enzima alostérica compleja cuya actividad es modulada por GTP, ATP, ADP y AMP (Lascu *et al.*, 1977). Esta enzima está localizada en la mitocondria y juega un papel catabólico central en el metabolismo del nitrógeno de éste y otros mamíferos. Los estudios recientes sobre las propiedades cinéticas de las GDHs de otros organismos han demostrado que éstas exhiben diferentes tipos de cinética cooperativa. El fenómeno se ha observado en las GDHs de especies tales como *Schizosaccharomyces pombe* (Perysinakis, 1994), *Psychrobacter* sp. (Di Fraia *et al.*, 2000) y *Ruminococcus flavefaciens* (Duncan *et al.*, 1992). Podría no llamar la atención el comportamiento alostérico de una de las isoenzimas de levadura. Sin embargo, se suele considerar que la regulación alostérica es exclusiva de las GDHs de mamíferos, debido a que las primeras GDHs que fueron caracterizadas en modelos bacterianos, tales como *E.*

*coli* (Sakamoto *et al.*, 1975) y *Bacillus megaterium* (Hemmila y Mantsala, 1978), no presentan cooperatividad en la catálisis. El caso de la enzima codificada por *GDH3* es un ejemplo más por el cual valdría la pena considerar la tendencia general a un comportamiento alostérico por parte de las enzimas de la familia de las GDHs hexaméricas.

Lo que sí parece exclusivo de las GDHs de mamíferos es la compleja regulación alostérica a la que son sujetas por parte de varios nucleótidos, así como el mecanismo molecular de cooperatividad que exhiben. El conocimiento de la estructura tridimensional de la enzima de hígado bovino por cristalografía de rayos X ha permitido identificar una región responsable del comportamiento cooperativo, compuesta por cerca de 50 aminoácidos (Peterson y Smith, 1999). Ausentes en todas las GDHs hexaméricas de procariontes y de hongos conocidas a la fecha, estos aminoácidos forman un brazo que facilita la interacción entre las subunidades durante el ciclo catalítico.

Cabe preguntarse entonces cuál es el mecanismo de cooperatividad en las GDHs de procariontes y de hongos que no presentan este dominio de asociación. Mediante la comparación de las GDHs de *Psychrobacter* sp. y *C. symbiosum* se ha logrado un acercamiento a este problema, pues la primera exhibe una cooperatividad positiva marcada, mientras que la segunda no muestra este comportamiento (Di Fraia *et al.*, 2000). La enzima de *Psychrobacter* sp. tiene una inserción de cinco residuos en el asa que une las hélices  $\alpha_{16}$  y  $\alpha_{17}$  correspondientes en *C. symbiosum*. Esta inserción parece contribuir al incremento en la flexibilidad de la proteína mediante un aumento en la longitud de esta asa que une a los dos dominios; se sabe que éstos se acercan y se alejan entre sí durante los cambios conformacionales que ocurren en ciclo catalítico (Yip *et al.*, 1995; Di Fraia *et al.*, 2000). Por tanto, se ha propuesto que la flexibilidad del asa facilita el fenómeno de cooperatividad en la enzima de *Psychrobacter* sp. Aquí vale la pena destacar que una de las diferencias importantes entre las topologías de Gdh1p y Gdh3p se encuentra precisamente en esta asa (**Figura 5**). Gdh3p tiene una inserción más larga en el asa que une las hélices  $\alpha_{16}$  y  $\alpha_{17}$ , además de registrar varias sustituciones de aminoácidos con respecto a Gdh1p en esta región. Al igual que la GDH de *Psychrobacter* sp., la enzima codificada por *GDH3* muestra una cooperatividad positiva en su catálisis, la cual podría ser favorecida por una inserción en la interfase de los dominios del polipéptido (Di Fraia *et al.*, 2000). Por sus diferentes propiedades alostéricas, las isoenzimas de levadura son un buen modelo para identificar experimentalmente el mecanismo responsable del comportamiento cooperativo de las GDHs hexaméricas de procariontes y de hongos.

### *Estabilidad de las proteínas*

Los homómeros de Gdh1p y de Gdh3p exhiben un comportamiento alostérico distinto, lo cual sugiere diferencias en las interacciones oligoméricas de estas proteínas. Además, se sabe que la única forma activa es el hexámero (West y Price, 1988), es decir, que la actividad NADP-GDH depende de las interacciones que mantienen a la estructura cuaternaria. Por lo anterior cabe preguntarse si las proteínas de levadura difieren en su estabilidad medida en términos de inactivación.

En los experimentos de desnaturalización con urea resultó evidente que las NADP-GDHs de levadura difieren en su estabilidad *in vitro*. Después de 20 horas de incubación, se perdió el 50% de la actividad de Gdh1p sólo al alcanzar una concentración de urea 1 M mayor que aquella necesaria para observar el mismo efecto sobre Gdh3p (**Figura 12**). Esta diferencia no se observó después de 95 horas de incubación, cuando los procesos de desnaturalización y renaturalización se encuentran en equilibrio.

Al ensayar la desnaturalización térmica de estas proteínas, se volvió a poner en evidencia la misma diferencia en estabilidad (**Figura 13**). El coeficiente de inactivación para Gdh3p, dado por la pendiente del regráfico que se presentan en la **Figura 13B**, resultó ser 3 veces mayor que para Gdh1p. Las constantes de inactivación mostraron una correlación lineal con la temperatura, así que la inactivación ocurre mediante un solo paso de desnaturalización. En estudios previos sobre la desnaturalización de las GDHs de varias especies, se ha encontrado que aunque la transición del hexámero al trímero se da sin cambios mayores en la estructura terciaria, ésta se acompaña de la pérdida total de la actividad enzimática (West y Price, 1988).

En el caso de las GDHs de organismos hipertermófilos, se sabe que los puentes iónicos son la interacción más importante para mantener la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína (Yip *et al.*, 1995). Nuestros resultados muestran que los homohexámeros formados por Gdh1p son más estables que aquellos ensamblados con monómeros de Gdh3p. En este contexto, sería pertinente comparar el número y la localización de los puentes iónicos que se dan en la estructura de las dos NADP-GDHs de levadura, sin embargo sería necesario conocer la estructura tridimensional de estas proteínas. De nueva cuenta hay que recalcar la posibilidad de un procesamiento diferencial de Gdh1p y Gdh3p que podría tener implicaciones en las diferencias de estabilidad de los homohexámeros correspondientes.

### *Desamidación espontánea*

Una inspección de los residuos de asparagina (Asn) que forman parte de la secuencia de las NADP-GDHs de levadura llevó a la identificación de un residuo teóricamente susceptible a la desamidación espontánea, que sólo está presente en Gdh3p. La desamidación de residuos de Asn es un fenómeno que puede alterar la integridad estructural de un polipéptido y resultar en la pérdida de su actividad biológica (Aswad, 1995). Como las diferencias en la estabilidad de las NADP-GDHs de levadura pueden ser el resultado de modificaciones covalentes específicas de este tipo, se evaluó la susceptibilidad de estas proteínas a la desamidación espontánea *in vitro*. El residuo N54 de Gdh3p se encuentra seguido de un residuo de glicina (Gly) en la secuencia aminoacídica, situación de flexibilidad que favorece la formación del intermediario de succinimida que puede provocar una desamidación. Por otra parte, N54 se encuentra en una de las regiones del polipéptido más expuestas al solvente: el asa que une a las hojas  $\beta_a$  y  $\beta_b$  correspondientes en *C. symbiosum* (**Figura 5**). Estas particularidades estructurales sugieren que el residuo N54 de Gdh3p es susceptible a la desamidación espontánea. En el ARTÍCULO 5 se presenta información sobre el fenómeno de la desamidación de proteínas, y se muestra el análisis teórico de la susceptibilidad de los diferentes residuos de Asn presentes en las NADP-GDHs de *S. cerevisiae*.

El corte por hidroxilamina es una prueba indirecta de la susceptibilidad de cierto residuo de Asn a la desamidación espontánea, ya que la acción de este agente químico se da por la misma vía de la succinimida. El tratamiento de las isoenzimas de levadura con hidroxilamina muestra dos sitios de corte para Gdh3p (N54 y N211), mientras que Gdh1 es digerido en un solo sitio compartido con su homólogo (N210) (**Figura 14A**). La incubación prolongada de Gdh3p a pH alcalino tiene como efecto un cambio en el patrón de migración electroforético nativo dado por un aumento en la carga negativa, fenómeno que sugiere una desamidación *in vitro* y que parece ser más lento en el caso de Gdh1p (**Figura 14B**). Estos resultados sugieren que las NADP-GDHs de levadura son susceptibles a la desamidación espontánea *in vitro*, y que las diferentes isoformas difieren en sus velocidades de desamidación debido a la presencia del mencionado residuo N54 exclusivo de Gdh3p.

El cambio en la carga neta de la NADP-GDH codificada por *GDH3* se vio acompañado por una disminución de la estabilidad de la proteína *in vitro* (**Figura 15**), lo cual sugiere que la presunta desamidación de esta proteína resulta en una pérdida de la integridad estructural. Por comparación con la estructura tridimensional de la GDH de *C.*

*ymbiosum*, el asa donde se localiza el residuo N54 de Gdh3p forma parte de la zona de interacción entre los dos trímeros que forman el hexámero activo. Dado que la desamidación de un residuo de Asn se da junto con la aparición de una carga negativa, se antoja especular que esta presunta modificación tendría implicaciones en la desestabilización de la estructura cuaternaria de la enzima codificada por *GDH3*. La hipótesis puede ponerse a prueba mediante el estudio comparativo de la desamidación de las isoenzimas de levadura y su efecto sobre la estabilidad de estas proteínas *in vitro* e *in vivo*.

## **2. Aspectos fisiológicos: la conservación de las NADP-GDHs como una adaptación metabólica en *S. cerevisiae***

Algunas de las propiedades bioquímicas de las isoenzimas estudiadas parecen ser fisiológicamente significativas, debido a que *GDH1* y *GDH3* están sujetos a una regulación diferencial por las condiciones de fuente de carbono del medio de cultivo, como ahora se describe. Asimismo, el comportamiento de las mutantes bajo diferentes condiciones sugiere que existe una especialización en las funciones de los genes que se han estudiado en este trabajo. Enseguida se consideran estos y otros aspectos de la caracterización fisiológica de las NADP-GDHs de *S. cerevisiae*.

### *Expresión diferencial e importancia de la fuente de carbono*

A partir del comportamiento alostérico de las NADP-GDHs, se puede asumir que sus propiedades catalíticas *in vivo* dependerán de las proporciones de Gdh1p y Gdh3p. Se estudiaron entonces las cantidades relativas de las proteínas bajo las diferentes condiciones de crecimiento dadas por la fuente de carbono. Para ello, se prepararon extractos de las cepas pertinentes de *S. cerevisiae* crecidas en medio mínimo con glucosa o etanol. Al comparar estas condiciones de cultivo, se encontró que la cantidad de Gdh1p se mantiene constante, tanto en las actividades específicas dependientes de esta proteína en una cepa *gdh3Δ*, como en su señal inmunoquímica (**Figura 16**). Sin embargo, la actividad enzimática dependiente de Gdh3p fue 20 veces mayor en los extractos obtenidos de una cepa *gdh1Δ* crecida en etanol, que en aquellas células crecidas en glucosa. De esta manera, la actividad dependiente de Gdh1p se mantuvo constante ante los cambios en la

fuelle de carbono, mientras que aquella dependiente de Gdh3p se indujo en presencia de una fuente de carbono no fermentable como el etanol. Los análisis densitométricos permitieron determinar que la NADP-GDH de la cepa silvestre crecida en glucosa corresponde a Gdh1p en su totalidad, y que cerca del 25% de la enzima es Gdh3p cuando las células crecen en etanol. Pese a no ser mayoritaria, esta fracción es fisiológicamente relevante, considerando que la mutante interrumpida en *GDH3* exhibe un crecimiento lento cuando se utiliza etanol como fuente de carbono.

Los cultivos prolongados de levaduras permiten analizar las células bajo condiciones de fuente de carbono cambiantes. Dichos cultivos tienen que ser efectuados en medios ricos, debido a que las levaduras pierden viabilidad después de algunas horas de crecimiento exponencial en un medio mínimo. En medio rico YPD, *S. cerevisiae* crece de manera exponencial mediante la fermentación de la glucosa del medio. Cuando este compuesto es consumido, ocurre el llamado cambio diáuxico que permite la adaptación al metabolismo respiratorio, utilizando el etanol producido por glucólisis (Fuge *et al.*, 1994). Como era de esperar, la actividad NADP-GDH depende exclusivamente de Gdh1p durante la fase de crecimiento exponencial (**Figura 17**). Sin embargo, durante el crecimiento posdiáuxico se observó una inducción de Gdh3p, que confirma los hallazgos previos de Boy-Marcotte *et al.* (1998). Durante el crecimiento posdiáuxico se registró un cambio gradual en las proporciones de las isoenzimas; después de cinco días de incubación en YPD, el 70% de la NADP-GDH corresponde a la enzima codificada por *GDH3*.

El cambio diáuxico es una respuesta rápida que permite la adaptación a la respiración mediante un reajuste de las vías metabólicas (DeRisi *et al.*, 1997). Por tanto, es poco probable que el exceso de Gdh3p sea una respuesta directa a este fenómeno, pues sólo se observa una mayor expresión relativa de esta proteína durante las fases tardías del cultivo. Dado que los experimentos fueron realizados en medio YPD, podría suponerse que las GDH anabólicas son poco relevantes en esta condición rica en fuente de nitrógeno. De hecho, la falta de *GDH1* o de *GDH3* no representa una pérdida en la viabilidad de las células en ninguna de las fases del crecimiento (Riego L., comunicación personal), por lo que parecen ser prescindibles en este medio de cultivo. El cambio en la proporción de las enzimas bien puede ser un reflejo de la acción regulatoria que el carbono del medio ejerce de modo diferencial sobre las NADP-GDHs. La presencia de Gdh1p depende de la disponibilidad de glucosa en estos medios de cultivo (**Figura 17**), mientras que la de Gdh3p depende de la ausencia del carbohidrato.



### *Regulación transcripcional de las NADP-GDHs y NAD-GDH*

La actividad GDH en *S. cerevisiae* está codificada por tres genes: las dos NADP-GDHs anabólicas y una NAD-GDH catabólica codificada por *GDH2*. Estos genes se encuentran bajo el control de sistemas regulatorios generales tanto del metabolismo del nitrógeno como del metabolismo del carbono (Dickinson, 1999b). El activador de los genes responsables del catabolismo del nitrógeno, *Gln3p*, regula de manera positiva la transcripción de *GDH1*, de *GDH2* y de *GDH3* (Daugherty *et al.*, 1993; Miller y Magasanik, 1991; Cox *et al.*, 1999). La expresión de *GDH1* también está sujeta a una regulación positiva por parte de *Leu3p*, el activador transcripcional de las vías de biosíntesis de aminoácidos ramificados (Hu *et al.*, 1995).

El sistema *HAP*, responsable de la inducción de los genes involucrados en la función respiratoria, ejerce un efecto sobre *GDH1*. La expresión de este gen es activada por fuentes de carbono como el etanol, el acetato y el lactato, todas ellas no fermentables (Dang *et al.*, 1996). Sin embargo, la regulación transcripcional de *GDH1* es más estricta durante el crecimiento respiratorio, porque la expresión del gen depende de un número mayor de factores transcripcionales que en condiciones de crecimiento fermentativo (Riego *et al.*, en preparación, ver ARTÍCULO 4). Por su parte, la GDH catabólica codificada por *GDH2* tiene en su promotor una secuencia activadora que responde a los cambios en la fuente de carbono, de modo tal que se aprecia una mayor actividad enzimática dependiente de *Gdh2p* en fuentes de carbono no fermentables como el etanol (Coschigano *et al.*, 1991). Entre los genes antes citados, *GDH3* es el único que se encuentra reprimido por glucosa al nivel de la transcripción. En medios de cultivo suplementados con fuentes de carbono no fermentables se observa una elevada expresión de *GDH3*, la cual es revertida si se agrega glucosa al medio, aún en presencia de la fuente inductora. La activación transcripcional de *GDH3* por etanol depende de un remodelamiento en la estructura de la cromatina (Avendaño A., comunicación personal). Esta serie de estudios indica que existe un control estricto de las vías NADP-GDH y NAD-GDH por parte de aquellos elementos reguladores que responden a la fuente de carbono.

### *Regulación de las NADP-GDHs por proteólisis*

El efecto regulatorio del carbono sobre las GDHs va más allá de la regulación transcripcional. Desde hace tiempo se tiene noticia de una regulación metabólica por

proteólisis de la NADP-GDH de *S. cerevisiae*, que se da después de una privación de la glucosa del medio (Mazón y Hemmings, 1979; Hemmings *et al.*, 1980). En nuestros experimentos en cultivos prolongados, la actividad NADP-GDH dependiente de Gdh1p cayó rápidamente después del consumo de la glucosa en el medio (**Figura 17**), confirmando lo anterior. Sin embargo, el mismo experimento sugiere que Gdh3p no es objeto de la mencionada inactivación por proteólisis; durante las fases tardías del cultivo y en ausencia total de glucosa se observa una actividad enzimática dependiente de esta isoforma.

Por lo anterior, se estudió el efecto de la privación de carbono sobre la actividad de las dos NADP-GDHs de levadura. Dado que *GDH3* se encuentra reprimido transcripcionalmente en glucosa, se utilizó una construcción quimérica donde la secuencia que codifica para Gdh3p se encuentra fusionada al promotor de *GDH1*. Así, Gdh3p se expresa de manera artificial en medios con glucosa. Tiempo después de que se indujo la privación de glucosa, sólo Gdh1p fue objeto de la inactivación por la proteólisis (**Figura 18**). Los resultados fueron similares cuando se llevó a cabo un experimento en el que las levaduras fueron privadas de etanol, demostrando que es la privación de la fuente de carbono la que desencadena la proteólisis específica de Gdh1p.

Nuestros datos demuestran que hay una selectividad por parte de la señal que desencadena la proteólisis, sugiriendo la existencia de un blanco diferente entre las isoformas de NADP-GDH de la levadura. Una inspección de las secuencias deducidas de aminoácidos reveló un sitio consenso en Gdh1p para la fosforilación por cinasa dependiente de AMP cíclico (KKYT), en la zona de interfase de los dominios del polipéptido (extremo carboxilo de la hélice  $\alpha_{16}$ ). La secuencia no se encuentra en Gdh3p, por lo que una fosforilación diferencial entre las isoenzimas podría ser la señal específica y responsable de la mencionada inactivación.

Las inmunoréplicas tipo *Western* revelaron que, en la cepa silvestre, Gdh1p desaparece más lento que en la mutante *gdh3Δ*, mientras que Gdh3p desaparece con mayor rapidez en la cepa silvestre que en la mutante *gdh1Δ* (**Figura 18**). Esta discrepancia puede explicarse por la ya mencionada formación de hexámeros híbridos en condiciones en las que los genes que codifican para las NADP-GDHs se expresan de manera simultánea. En otras palabras, parece existir una protección parcial de Gdh1p cuando éste se encuentra unido con Gdh3p, así como una inactivación más rápida de Gdh3p al estar asociado con Gdh1p.

La velocidad de inactivación por proteólisis es más rápida en otros sistemas regulatorios, por lo que se puede poner en duda la relevancia fisiológica de este mecanismo de inactivación de la NADP-GDH de levadura codificada por *GDH1*. Por ejemplo, la permeasa general de aminoácidos (Gap1p) desaparece por completo después de 30 minutos de la adición de amonio al medio (Springael *et al.*, 1999). Con todo, la proteólisis de Gdh1p podría tener relevancia en la regulación de la vía; ante una privación de carbono se inactivaría gradual y específicamente la NADP-GDH que tiene una mayor velocidad de consumo de  $\alpha$ -cetoglutarato.

#### *Caracterización fenotípica de las mutantes*

La **Figura 19** resume la caracterización fisiológica de las mutantes generadas en este trabajo. El comportamiento de las mutantes crecidas en glucosa confirmó que Gdh1p es la vía principal para la biosíntesis de glutamato en estas condiciones, porque sólo las mutantes inactivadas en esta isoenzima exhibieron un fenotipo de crecimiento lento. Como era de esperar, dada la represión transcripcional de *GDH3*, la presencia de este gen en multicopia no corrigió el defecto de crecimiento lento en glucosa. En los experimentos en los que se usó etanol como fuente de carbono, tanto las mutantes sencillas en *gdh1 $\Delta$*  como en *gdh3 $\Delta$*  crecieron a una velocidad menor que la silvestre. Esto concuerda con el hecho de que las NADP-GDHs se expresan simultáneamente en etanol, y podría pensarse que el efecto de las mutaciones sencillas sobre el crecimiento es de dosis; *GDH1* o *GDH3* por sí solos no alcanzarían la expresión necesaria en dicha condición. Sin embargo, las señales inmunoquímicas de las proteínas y la actividad NADP-GDH fueron las mismas en una cepa silvestre que en una mutante *gdh3 $\Delta$*  (**Figura 16**). Además, la sobreexpresión de alguna de las NADP-GDHs en el fondo genético de una doble mutante no fue capaz de corregir el fenotipo observado en etanol. Incluso, la presencia de *GDH1* en multicopia provocó un crecimiento más lento que aquel mostrado por la mutante *gdh3 $\Delta$*  que expresa *GDH1* en una sola copia cromosómica, lo cual sugiere un efecto nocivo de este gen, cuando está presente en multicopia, en condiciones de crecimiento respiratorio. La proliferación en etanol depende de la presencia de dos enzimas NADP-GDH diferentes, codificadas por *GDH1* y *GDH3*.

Cuando el metabolismo energético es fermentativo y no depende del ciclo del citrato, Gdh1p es la única NADP-GDH que se expresa. Dado el comportamiento de las

mutantes en condiciones de fermentación y de respiración, se puede proponer que la expresión diferencial de estos genes responde a que Gdh1p es la isoenzima de alta afinidad por  $\alpha$ -cetoglutarato, y una elevada actividad NADP-GDH en condiciones de crecimiento fermentativo no comprometería al metabolismo energético. En este contexto, *K. aerogenes* exhibe una auxotrofia debida a una limitación de  $\alpha$ -cetoglutarato y succinilcoenzima A, cuando se sobrexpresan el gen *gdhA* que codifica para la GDH anabólica de este organismo (Janes *et al.*, 2001). De modo similar, las concentraciones intracelulares de  $\alpha$ -cetoglutarato y de glutamina son la señal que regula de manera coordinada los metabolismos de carbono y de nitrógeno en *E. coli* (Ninfa *et al.*, 2000).

Para evaluar lo anterior, se investigó si existen diferencias en las velocidades de consumo de  $\alpha$ -cetoglutarato *in vivo*, utilizando para este fin las diferentes cepas que carecen o sobrexpresan las NADP-GDHs. Las mutantes mostraron cambios en sus concentraciones intracelulares de  $\alpha$ -cetoglutarato con respecto a la cepa silvestre (**Figura 19**). En glucosa, la falta de Gdh1p provoca una acumulación de  $\alpha$ -cetoglutarato, sugiriendo una disminución en la velocidad de síntesis de glutamato en estas mutantes. Por su parte, la falta de Gdh3p o la sobrexpresión de *GDH1* producen una caída en la concentración intracelular de este compuesto durante la proliferación en etanol. Por tanto, el crecimiento lento se debe a un consumo desequilibrado de  $\alpha$ -cetoglutarato en las mutantes que carecen de Gdh3p o que sobrexpresan *GDH1* en etanol. Sería pertinente evaluar si la sobrexpresión de *GDH3* es capaz de contrarrestar el fenómeno de crecimiento lento y disminución de la concentración intracelular de  $\alpha$ -cetoglutarato de las cepas que portan *GDH1* en vectores multicopia.

La actividad de la NAD-GDH catabólica codificada por *GDH2* puede ser útil como un reportero de la producción intracelular de glutamato (Coschigano *et al.*, 1991). En etanol, se registró una activación de la NAD-GDH catabólica en las mutantes interrumpidas en *GDH3*, así como en las cepas que sobrexpresan cualquiera de las NADP-GDHs (**Figura 19**). Aparentemente, existe un umbral en la producción de glutamato a partir del cual se activa la NAD-GDH, enzima regulada de manera positiva por la concentración de este aminoácido que es su sustrato. Sin embargo, no resulta del todo clara la acumulación de  $\alpha$ -cetoglutarato cuando se sobrexpresan *GDH3*. Podría especularse que dicha sobrexpresión tiene como efecto la activación de Gdh2p, cuya velocidad catalítica *in vivo* es mayor que la de Gdh3p en el sentido anabólico, por lo que se observa la acumulación de  $\alpha$ -cetoglutarato.

*Regulación metabólica de las NADP-GDHs*

El esquema que se muestra en la **Figura 20** resume las interpretaciones de los resultados arriba expuestos. *S. cerevisiae* es una levadura adaptada al metabolismo anaerobio facultativo. En condiciones fermentativas, el metabolismo energético depende exclusivamente de las fosforilaciones a nivel de sustrato de la glucólisis; los genes involucrados en la función respiratoria y controlados por el sistema *HAP* están reprimidos (Forsburg y Guarente, 1989). Sin embargo, la expresión de algunos genes del ciclo del citrato se mantiene en condiciones fermentativas por la acción de *RTG* (Liu *et al.*, 1999). Este sistema regulatorio es reprimido por glutamato y su función principal es asegurar que en condiciones fermentativas se produzca suficiente de  $\alpha$ -cetoglutarato para la biosíntesis de glutamato y de otros compuestos nitrogenados. Tomando en cuenta lo anterior, no es de extrañar que en esta condición se exprese sólo una NADP-GDH de alta afinidad por  $\alpha$ -cetoglutarato, y cuya actividad catalítica no es regulable.

Cuando la fuente de carbono es no fermentable, la generación de energía depende exclusivamente de la fosforilación oxidativa, es decir, de la función respiratoria. En esta condición, todos los genes del ciclo del citrato se inducen por la acción del sistema *HAP*, entre ellos el complejo  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa. En este caso, el  $\alpha$ -cetoglutarato ya no es un simple intermediario de las rutas anabólicas. Por el contrario, la biosíntesis de glutamato por acción de la NADP-GDH dependerá de que la función respiratoria esté asegurada en términos de la concentración de los intermediarios del ciclo del citrato. Esto es posible gracias a la inducción de *GDH3*, que codifica una NADP-GDH de baja afinidad por  $\alpha$ -cetoglutarato, y de comportamiento alostérico. Además, podría considerarse la acción diferencial del fosfato inorgánico, porque *Gdh3p* es más sensible al efecto inhibitorio de este compuesto. La concentración intracelular de fosfato inorgánico puede reflejar el estado energético de la célula, al estar inversamente relacionada con la concentración de ATP.

Las características de la regulación transcripcional de *GDH1* concuerdan con este modelo: como se mencionó con anterioridad, se sabe que la expresión del gen se encuentra regulada de una manera más estricta durante el crecimiento respiratorio (Riego *et al.*, en preparación; ver ARTÍCULO 4). Por otra parte, los resultados de este trabajo han mostrado que *Gdh1p* se inactiva específicamente por proteólisis ante una privación de carbono. Hasta donde se ha podido observar, la expresión de *Gdh3p* se mantiene constantes siempre y cuando el etanol sea la fuente de carbono. Se puede suponer entonces que la presencia relativa de *Gdh1p* y *Gdh3p* y, por tanto, las propiedades

cinéticas de la NADP-GDH en una condición de crecimiento respiratorio, dependen de la regulación transcripcional y metabólica de la enzima codificada por *GDH1*.

Hay varios aspectos del metabolismo que no están contemplados en este trabajo, y que sería necesario abordar para salir del reduccionismo que nuestras interpretaciones implican. Primero, no se cuenta con información suficiente sobre el papel del ciclo GS/GOGAT, la otra vía que participa en la asimilación de amonio y que también utiliza  $\alpha$ -cetoglutarato. Sería pertinente conocer el comportamiento de las mutantes *glt1Δ* en combinación con la inactivación de las GDHs. Lo único que hasta el momento se sabe es que una triple mutante *gdh1Δ gdh3Δ glt1Δ* es auxótrofa total de glutamato (Avenidaño *et al.*, 1997, ver ARTÍCULO 2). Otro aspecto a considerar es el de las transaminasas de aspartato, enzimas que también usan  $\alpha$ -cetoglutarato como sustrato, ya que se sabe que existe una estrecha relación entre la síntesis de glutamato y la acción de dichas transaminasas (Kang *et al.*, 1982). Por otra parte, ha llamado la atención que una interrupción de *GDH2* no exhibe fenotipo alguno en etanol, pese a la inducción de este gen en condiciones de crecimiento respiratorio (Coschigano *et al.*, 1991). A partir de nuestras observaciones, se puede predecir que será una doble mutante *gdh2Δ gdh3Δ* la que exhibirá un defecto en su crecimiento, debido a un elevado consumo de  $\alpha$ -cetoglutarato por la acción de los homómeros de Gdh1p, y la incapacidad de regenerar este compuesto por la vía NAD-GDH.

Mucho de lo discutido en esta sección podría cambiar de dirección si se conociera con precisión la localización subcelular de las enzimas del metabolismo central del nitrógeno. Con todo, no existe hasta ahora evidencia de que alguna de estas proteínas se encuentre localizada en un compartimento distinto al citoplasma (Escamilla, 2002).

#### ¿Redundancia funcional?

Es común que se considere *a priori* que los casos de redundancia génica son casos de redundancia funcional. Históricamente, la redundancia funcional se ha determinado cuando la inactivación de cierto gen duplicado no resulta en un fenotipo evidente; la presencia del parálogo puede suplir la falta del gen en cuestión (Brookfield, 1997). Partiendo de esta definición, los genes *GDH1* y *GDH3* no son redundantes, ya que existe al menos una condición en la que ambos son indispensables para el crecimiento normal en términos de velocidad.

Las proteínas que estos genes codifican son redundantes en su función bioquímica: hasta donde se ha podido observar, ambas catalizan la misma reacción y usan los mismos sustratos. Por ejemplo, ninguna de ellas presenta actividad catalítica si se ensaya la reacción con NADH y su actividad dependiente de NADP<sup>+</sup> en dirección de la desaminación oxidativa es baja para ambas isoformas.

Sin embargo, las isoenzimas tienen particularidades en algunos aspectos de su regulación metabólica tales como el comportamiento alostérico, la respuesta a inhibidores y la inactivación proteolítica. Además, la regulación transcripcional de los genes *GDH1* y *GDH3* es diferente, al menos en lo que respecta a su expresión dependiente de la fuente de carbono. Con los resultados de este trabajo queda demostrado que la conservación y especialización de dos NADP-GDHs constituye una adaptación metabólica en *S. cerevisiae*. La coincidencia de la duplicación de estos genes con el desarrollo de la capacidad de crecer en condiciones de anaerobiosis sugiere que dicha especialización forma parte del mecanismo de adaptación al metabolismo facultativo de esta levadura.

### **3. Consideraciones evolutivas: ¿es la conservación de las NADP-GDHs el reflejo de un mecanismo general de adaptación al metabolismo facultativo en *S. cerevisiae*?**

#### *La vía NADP-GDH en otras levaduras*

La capacidad de proliferar en condiciones anaerobias mediante la fermentación vigorosa de carbohidratos es una de las propiedades que distingue a *S. cerevisiae* de las levaduras con las que se encuentra filogenéticamente relacionada. La diversidad fisiológica del grupo de los hemiascomicetos ha sido estudiada a nivel genómico, encontrándose que uno de los principales determinantes genéticos de la especiación de levaduras es la especialización de un mismo repertorio de proteínas estructurales, regulatorias y catalizadoras. Es esta especialización la que ha permitido la emergencia de circuitos regulatorios específicos en cada una de las especies (Gaillardin *et al.*, 2000).

En este trabajo se ha descrito la relevancia de la vía NADP-GDH en la adaptación al metabolismo facultativo de una levadura como *S. cerevisiae*. A la fecha, no hay evidencia de la existencia de dos o más genes que codifiquen para esta actividad enzimática en alguno de los aerobios estrictos cuyos genomas han sido secuenciados parcialmente (Souciet *et al.*, 2000). Por el contrario, está demostrado experimentalmente que *K. lactis*

tiene un solo gen que codifica para la NADP-GDH (Romero *et al.*, 2000). En cuanto a las levaduras facultativas, la secuencia parcial del genoma de *Saccharomyces bayanus* ha revelado la presencia de dos genes para NADP-GDH (Bon *et al.*, 2000). La divergencia de esta especie con *S. cerevisiae* se dio después de la duplicación que originó los genes *GDH1* y *GDH3*, de acuerdo con la comparación de estas secuencias (**Figura 21**). Las habilidades anaerobias de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* son de origen monofilético (Møller *et al.*, 2001), por lo que puede suponerse que la conservación de los parálogos en *S. bayanus* responde a una especialización metabólica similar a la que aquí se ha descrito para *S. cerevisiae*. La relación filogenética entre estas especies es estrecha, por lo que podría no llamar la atención que se compartan los parálogos. En este contexto, valdría la pena explorar la distribución de esta duplicación a lo largo del linaje de los hemiascomicetos, con el fin de evaluar directamente su relación con el origen de las propiedades facultativas dentro del grupo.

#### *Duplicación genómica y adaptación al metabolismo facultativo*

Al presentar la evidencia molecular de una duplicación ancestral del genoma de *S. cerevisiae*, Wolfe y Shields (1997) sugieren que la tetraploidía degenerada pudo haber facilitado la evolución hacia la fermentación anaerobia en este organismo. Los autores hacen notar que la fecha estimada del evento de duplicación (100 millones de años) corresponde al tiempo en el que las angiospermas y sus frutos colonizaron la flora terrestre. Posteriormente, Piškur (2001) sugiere que el origen de la habilidad de crecer en anaerobiosis ocurre poco tiempo después de la duplicación genómica. Por ello, el autor concluye que ésta pudo haber constituido el punto de partida para la especialización de ciertas proteínas, permitiendo su función óptima en condiciones de ausencia de oxígeno. En el ARTÍCULO 3 se discuten algunas de las hipótesis acerca del valor fisiológico de la redundancia génica en *S. cerevisiae*.

Si bien la poliploidía puede representar la oportunidad de una especialización funcional de todo el repertorio génico, existen varias razones para no conservar genes por duplicado. De hecho, la tendencia a la compactación genómica parece ser una característica de los microorganismos que compiten por el mismo recurso, asegurando una mayor rapidez en la replicación del DNA y, por tanto, de la proliferación celular (Fredrickson y Stephanopoulos, 1981). La organización del genoma de varios hemiascomicetos pone en evidencia esta tendencia, por sus regiones intergénicas reducidas y la ausencia casi total



de intrones. Esta presión por mantener una estructura genómica compacta podría explicar por qué se han perdido la mayor parte de las copias producto de la duplicación ancestral (Keogh *et al.*, 1998).

### *Conservación por efecto de dosis génica*

Como se ha mencionado, entre la mayor parte de los genes duplicados de *S. cerevisiae* no parece haber una divergencia funcional considerable, ya que las proteínas que éstos codifican suelen llevar a cabo la misma función bioquímica. Esto sugiere que en la mayoría de los casos los genes redundantes han sido conservados para llevar a cabo la función preexistente, pero de una manera más eficiente. Sin embargo, no hay a la fecha evidencia que demuestre que esta eficiencia tenga que ver con la presunta especialización funcional de proteínas sugerida por Piškur (2001), al menos en un número representativo de casos de duplicación.

Por el contrario, el único estudio global que se ha llevado a cabo apunta a que algunos genes duplicados se han conservado por un simple efecto de dosis, y no necesariamente por la especialización de sus productos (Seoighe y Wolfe, 1999a). Muchas de las categorías funcionales del genoma de *S. cerevisiae* con alta representación de genes duplicados incluyen genes que se expresan de manera intensa, tales como los de transporte y metabolismo de carbohidratos, respuesta a estrés, y proteínas ribosomales citoplasmáticas. Mientras sólo el 6% del genoma se expresa en cantidades mayores de 10 moléculas de RNAm por célula, según datos de análisis global de la transcripción, 17% de los genes duplicados se expresa intensamente –una fracción significativamente desviada del promedio. Así, los autores hacen notar que existe una tendencia a retener por duplicado genes de expresión elevada, y concluyen que el aumento en la dosis génica que lleva al incremento en la expresión de estos genes pudo haber sido uno de los factores determinantes de su conservación.

### *Especialización funcional: casos descritos*

Si bien un efecto de dosis génica explica satisfactoriamente la conservación de una fracción de los genes redundantes, resta un 83% de los genes duplicados que no se expresan de manera intensa, al menos en las condiciones estudiadas, y que sin embargo se han conservado por duplicado. Dentro de esta fracción mayoritaria, podría haber casos de

especialización funcional que han pasado inadvertidos por falta de estudios comparativos que permitan conocer las propiedades particulares de los productos de estos genes estructuralmente redundantes.

Además del caso de las NADP-GDHs descrito a lo largo de este trabajo, se sabe de otros eventos de especialización funcional de genes redundantes en *S. cerevisiae*. Las proteínas duplicadas Pip2p y Oaf1p son factores de transcripción de la familia Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub>, que tienen un papel en la regulación de la  $\beta$ -oxidación en los peroxisomas. Por lo general, los miembros de esta familia forman heterodímeros capaces de unirse al DNA, pero Pip2p y Oaf1p se ensamblan en forma de heterodímeros cuando se expresan de manera simultánea (Baumgartner *et al.*, 1999). Los genes que codifican estas proteínas están regulados de manera diferencial: sólo *OAF1* responde al inductor, que es el ácido oleico, mientras que ambos genes son reprimidos por glucosa. Este sistema de respuesta al ácido oleico constituye una forma de regular la transcripción de genes para proteínas de peroxisomas según la fuente de carbono. El ejemplo es útil para mostrar que esta compleja regulación no puede existir en las especies donde el mencionado activador transcripcional se encuentra en una sola copia génica.

Existen otros casos que apuntan hacia una especialización que tiene que ver directamente con el metabolismo facultativo de la levadura. Los pares de genes *COX5a/COX5b*, *CYC1/CYC7*, *AAC2/AAC3* y *TIF51a/TIF51b* codifican para productos estructuralmente redundantes, pero que se expresan de manera diferencial en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis (Kwast *et al.*, 1998). Así, para cada pareja existe una isoforma aerobia, que sólo se expresa bajo concentraciones de oxígeno mayores a 1  $\mu$ mol por litro, y una isoforma anaerobia que se expresa en condiciones hipóxicas. Estos genes redundantes son un ejemplo llamativo de adaptación funcional al metabolismo facultativo, pues la divergencia en su expresión parece reflejar una especialización en las proteínas que codifican. Además, los cuatro pares citados forman parte de los bloques de genes que son resultado de la duplicación ancestral del genoma de *S. cerevisiae*.

Las proteínas codificadas por *COX5a* y *COX5b* forman la subunidad V de la citocromo *c* oxidasa (COX), y confieren propiedades cinéticas diferentes al complejo transportador de electrones (Waterland *et al.*, 1991). Las isoformas de la subunidad V parecen modular la holoenzima *in vivo* mediante una alteración de las velocidades de transferencia de uno o más electrones. La COX que se expresa en aerobiosis es la isoforma Vb que exhibe mayor capacidad catalítica y número de recambio. Por otra parte,

*CYC1/CYC7* codifican para dos isoformas del citocromo *c*. La actividad COX es modulada por los diferentes citocromo *c*, y en este caso también existe una isoforma que confiere mayor capacidad catalítica (Allen *et al.*, 1995). Existe además una proteólisis específica dependiente de ubiquitina, que también es responsable de la baja actividad dependiente de *Cyc7p* en aerobiosis (Pearce y Sherman, 1997). Lo anterior implica que en condiciones de metabolismo fermentativo se expresa una COX distinta de aquella que se ensambla durante el crecimiento respiratorio, y ésta a su vez puede interactuar con alguna de las isoformas de citocromo *c*. Es muy probable que la complejidad en la regulación de esta actividad catalítica responda a una adaptación al metabolismo facultativo en *S. cerevisiae*.

Los genes *AAC2* y *AAC3* codifican para proteínas de membrana mitocondrial que son transportadores de ATP/ADP. Aún cuando *Aac2p*, *Aac3p* y su homólogo *Aac1p* tienen propiedades de translocación prácticamente idénticas en membranas mitocondriales aisladas, las mutantes exhiben fenotipos particulares que sugieren distintas funciones para estos genes (Drgon *et al.*, 1992). Por su parte, *TIF51a* y *TIF51b* codifican para dos isoformas del factor eIF-5 de inicio de la traducción. En este caso, no existe evidencia alguna para sugerir que estas proteínas tengan funciones divergentes, porque una mutante *tif51a*Δ que crece lento en aerobiosis puede ser complementada si se expresa artificialmente su homólogo *TIF51b*, el cual normalmente está reprimido en esta condición (Schwelberger *et al.*, 1993).

Éstos casos de especialización funcional parecen conferir una versatilidad regulatoria en la fisiología de *S. cerevisiae*, junto con aquel de las isoenzimas NADP-GDH descrito a lo largo de este trabajo. También aquí, los citados pares de genes se originaron probablemente a partir del mismo evento de duplicación genómica ancestral, el cual parece coincidir en tiempos filogenéticos con el desarrollo de la habilidad de crecer en condiciones anaeróbicas. Por lo anterior, no sería de extrañar que muchos de los casos citados de especialización formen parte del remodelamiento que necesariamente tuvo que haber ocurrido durante el proceso de adaptación al metabolismo facultativo.

#### *Conservación de enzimas duplicadas*

El potencial evolutivo de ciertas funciones celulares está estrechamente relacionado con la forma en que éstas son reguladas. En el caso de las vías metabólicas, formadas por elementos genéticos (enzimas) estrechamente coordinados, la presencia de elementos

duplicados (isoenzimas) puede representar una flexibilidad en la regulación de la vía (Kirschner y Gerhart, 1998). Dada la ausencia de intrones que generalmente exhiben los hemiascomicetos, el corte y empalme alternativo no puede ser un mecanismo considerable para la generación de nuevos elementos. Por lo anterior, la conservación de genes duplicados que codifican para enzimas es un mecanismo para el aumento del potencial evolutivo de las vías metabólicas.

Si la conservación de isoenzimas ha sido un camino determinante de la adaptación metabólica de *S. cerevisiae*, sería de esperar que esta conservación exhiba un sesgo hacia aquellas rutas metabólicas que han experimentado dicha especialización. El **Cuadro 7** muestra nuestro análisis estadístico de la proporción de enzimas redundantes presentes en las distintas vías metabólicas que define el catálogo funcional del *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG, <http://www.genome.ad.jp>). El análisis considera aquellas isoenzimas que supuestamente son resultado de la ya mencionada duplicación genómica (Seoighe y Wolfe, 1999b). Salta a la vista la alta proporción de duplicaciones en las enzimas del metabolismo del carbono, las cuales fueron estadísticamente más frecuentes que el promedio general de enzimas duplicadas en el genoma. Incluso, muchas de las isoenzimas duplicadas de otras vías (metabolismo de aminoácidos, de nucleótidos y de generación de energía) utilizan como sustrato algún intermediario del metabolismo central de carbono. El análisis de las subcategorías del KEGG (no se muestra), reveló que existe una tendencia a conservar por duplicado las enzimas necesarias para la utilización anaeróbica de carbohidratos, mientras que las del metabolismo aerobio se mantienen en el promedio: la mayoría de las duplicaciones ocurren en las vías de la glucólisis, las pentosas fosfatadas y el metabolismo del piruvato, mientras que las duplicaciones en el ciclo del citrato, el ciclo del glioxalato o la fosforilación oxidativa se mantienen en el promedio general.

Estas observaciones sugieren, de manera indirecta, que las isoenzimas del metabolismo central del carbono facilitan la utilización anaeróbica de carbohidratos en *S. cerevisiae*, lo cual puede responder a una especialización en su regulación, o bien a un efecto de dosis en la expresión de los genes que las codifican, como lo han descrito Seoighe y Wolfe (1999) para las enzimas de la glucólisis.

*Consideraciones finales*

Hasta ahora no se han llevado a cabo estudios sistemáticos que permitan determinar cuál es la fracción de proteínas estructuralmente redundantes que han experimentado una especialización en su función. Por esto, tampoco se sabe si dicha redundancia ha facilitado de alguna manera la adaptación al metabolismo facultativo en *S. cerevisiae*. Sin embargo, se han descrito casos de divergencia funcional de proteínas codificadas por genes duplicados que parecen conferir una versatilidad regulatoria para ciertas funciones celulares. Visto de esta manera, no puede descartarse que la presencia de algunas vías metabólicas duplicadas haya significado un aumento en el potencial evolutivo durante el proceso de adaptación al metabolismo anaerobio facultativo y, por tanto, que muchos de estos genes redundantes estén actualmente especializados en su regulación metabólica o transcripcional bajo condiciones fermentativas o respiratorias. Para probar esta hipótesis, será indispensable el análisis global de la expresión de genes duplicados bajo estas condiciones, así como la caracterización sistemática de los fenotipos de aquellas cepas de levadura interrumpidas en secuencias redundantes.

Cuadro 3

**Cuadro 3a.** Purificación de la NADP-GDH codificada por *GDH1*

Paso de purificación	proteína	actividad	actividad	Act. Esp.	purificación	recuperación
	<i>mg ml<sup>-1</sup></i>	<i>U ml<sup>-1</sup></i>	<i>U</i>	<i>U mg<sup>-1</sup></i>	<i>X</i>	<i>%</i>
Extracto crudo	17.4	80.5	4,065	3.68	1	100
Precipitación con sulfato de amonio (40-65%)	54.2	65.6	2,503	4.95	1.3	62
Cromatografía de intercambio aniónico	9.6	84.4	1,940	17.5	4.8	48
Cromatografía de afinidad	1.10	145.5	775	132.3	36	19

Extracto de la cepa CLA14-11 (*ghd1Δ gdh3Δ / p2μ-GDH1*).

**Cuadro 3b.** Purificación de la NADP-GDH codificada por *GDH3*

Paso de purificación	proteína	actividad	actividad	Act. Esp.	purificación	recuperación
	<i>mg ml<sup>-1</sup></i>	<i>U ml<sup>-1</sup></i>	<i>U</i>	<i>U mg<sup>-1</sup></i>	<i>X</i>	<i>%</i>
Extracto crudo	13.7	14.6	5,109	2.47	1	100
Precipitación con sulfato de amonio (40-65%)	51.1	57.9	3,318	3.15	1.3	65
Cromatografía de intercambio aniónico	8.3	64.7	1,364	15.6	6.3	27
Cromatografía de afinidad	1.02	123.5	343	121.0	49	7

Extracto de la cepa CLA14-22 (*ghd1Δ gdh3Δ / p2μ-GDH3*).

**Cuadro 3c.** Purificación de la NADP-GDH de una cepa silvestre que expresa *GDH1* y *GDH3*

Paso de purificación	proteína	actividad	actividad	Act. Esp.	purificación	recuperación
	<i>mg ml<sup>-1</sup></i>	<i>U ml<sup>-1</sup></i>	<i>U</i>	<i>U mg<sup>-1</sup></i>	<i>X</i>	<i>%</i>
Extracto crudo	1.3	1.33	213	0.56	1	100
Precipitación con sulfato de amonio (40-65%)	4.3	7.66	107	0.80	1.4	50
Cromatografía de intercambio aniónico	1.5	29.3	66	19.5	34.8	31
Cromatografía de afinidad	1.1	155.1	39	141.0	252	18

Extracto de la cepa CLA4 (silvestre).

**Cuadro 4a.** Parámetros cinéticos (aminación reductiva)

	NADPH		amonio		$\alpha$ -cetoglutarato		
	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$	$S_{0.5}$	$n_H$	$V_{max}'$
	$\mu M$	$U\ mg^{-1}$	$mM$	$U\ mg^{-1}$	$mM$		$U\ mg^{-1}$
$\alpha_6$ Gdh1p	11.3	131.2	5.96	148.1	0.29	1.3	131.0
$\alpha_6$ Gdh3p	33.1	144.5	5.00	136.8	1.27	1.5	136.2

Una unidad de actividad NADP-GDH se define como  $\mu$ moles de NADPH oxidado por minuto. La reacción fue medida a diferentes concentraciones de uno de los sustratos, y saturantes de los dos restantes (NADPH 200  $\mu M$ , amonio 50 mM y  $\alpha$ -cetoglutarato 8 mM), en amortiguador Tris 100 mM, pH 7.2).

**Cuadro 4b.** Parámetros cinéticos (aminación reductiva)

	NADP <sup>+</sup>		glutamato	
	$K_m$	$V_{max}$	$K_m$	$V_{max}$
	$\mu M$	$U\ mg^{-1}$	$mM$	$U\ mg^{-1}$
$\alpha_6$ Gdh1p	14.1	48.5	9.79	59.9
$\alpha_6$ Gdh3p	10.5	50.2	6.36	51.1

Una unidad de actividad NADP-GDH se define como  $\mu$ moles de NADP<sup>+</sup> reducido por minuto. La reacción fue medida a diferentes concentraciones de uno de los sustratos, y saturantes de los dos restantes (NADP<sup>+</sup> 300  $\mu M$  y glutamato 100 mM), en amortiguador Tris 100 mM, pH 8.0).

Cuadro 5. Efecto del pH sobre los parámetros cinéticos de Hill

pH	$\alpha_6\text{Gdh1p}$			$\alpha_6\text{Gdh3p}$		
	$\alpha$ -cetoglutarato			$\alpha$ -cetoglutarato		
	$S_{0.5}^a$	$n_H^b$	$V'^c$	$S_{0.5}^a$	$n_H^b$	$V'^c$
	mM		$U\text{ mg}^{-1}$	mM		$U\text{ mg}^{-1}$
7.8	0.33	1.25	112.8	1.08	1.52	121.3
7.2	0.30	1.29	132.1	1.18	1.53	123.2
6.6	0.31	1.25	148.3	1.17	1.53	144.0
6.2	0.30	1.26	144.0	1.30	1.69	131.8
6.0	-	-	-	1.56	1.84	92.8
5.8	0.36	1.35	74.9	2.3	2.05	64.5
5.5	0.43	1.39	53.9	2.4	2.07	26.3

Una unidad de actividad NADP-GDH se define como  $\mu\text{moles}$  de NADPH oxidado por minuto. Los parámetros fueron obtenidos mediante el ajuste gráfico a la ecuación de Hill, con el programa Microcal Origin (4.1). La reacción fue medida a concentraciones saturantes de NADPH y amonio (200  $\mu\text{M}$  y 50 mM, respectivamente), en ácido acético 25 mM, MES 25 mM y Tris 50 mM. Este amortiguador permite cambios en el pH sin alterar la fuerza iónica del solvente.

<sup>a</sup>  $S_{0.5}$ , concentración de sustrato a la cual se observa la mitad de la  $V'$ .

<sup>b</sup>  $n_H$ , número de Hill.

<sup>c</sup>  $V'$ , velocidad máxima aparente.



**Cuadro 6. Efecto de diversos compuestos sobre la actividad NADP-GDH**

	$\alpha_6$ Gdh1p	$\alpha_6$ Gdh3p
	%	%
control <sup>a</sup>	100	100
ATP (1 mM)	82	80
ADP (1 mM)	83	74
AMP (1 mM)	91	97
AMPc (1 mM)	88	87
GTP (1 mM)	73	63
GDP (1 mM)	85	28
GMPC (1 mM)	79	77
UTP (1 mM)	86	73
Fructosa-1,6,bP (5 mM)	81	41
Glucosa-6P (5 mM)	109	107
Isocitrato (5 mM)	80	93
Glioxalato (5 mM)	25	11
Fumarato (5 mM)	31	23
Fosfoenolpiruvato (5 mM)	89	84
Alantoinato (5 mM)	75	75
3-Fosfoglicerato (5 mM)	73	55
Malato (5mM)	26	21

La actividad fue medida en la dirección de la biosíntesis de glutamato (aminación reductiva) y se muestra como el porcentaje de los controles respectivos.

<sup>a</sup> Las reacciones fueron medidas en ácido acético 25 mM, MES 25 mM y Tris 50 mM (pH 5.8). Se usaron concentraciones saturantes de NADPH (200  $\mu$ M) y amonio (50 mM), mientras que la concentración de  $\alpha$ -cetoglutarato usada fue cercana a valor de  $S_{0.5}$  (0.3 mM y 2 mM para Gdh1p y Gdh3p, respectivamente).

**Cuadro 7.** Representación de enzimas duplicadas en el metabolismo de *S. cerevisiae*

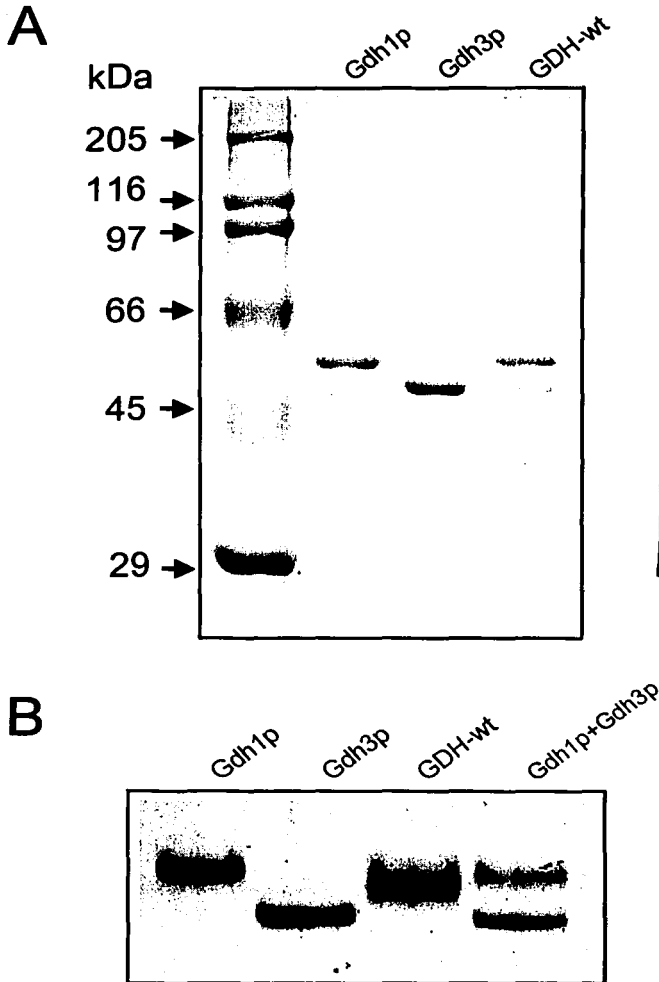
vías metabólicas	enzimas en la categoría <sup>a</sup>	enzimas duplicadas <sup>b</sup>	$\chi^2$ <sup>c</sup>
<i>Todas las enzimas del metabolismo</i>	370	58 (16%)	
Carbohidratos complejos	34	14 (41%)	14
Carbohidratos simples	75	22 (30%)	8.9
Lípidos complejos	30	6 (20%)	
Nucleótidos	54	10 (19%)	
Lípidos simples	31	3 (10%)	
Generación de energía	46	8 (17%)	
Aminoácidos que no forman proteínas	29	5 (17%)	
Aminoácidos que forman proteínas	40	14 (10%)	
Cofactores y vitaminas	61	3 (5%)	4.5

<sup>a</sup> Las categorías de vías metabólicas y enzimas fueron tomadas del catálogo funcional del KEGG (<http://www.genome.ad.jp>).

<sup>b</sup> Se usó el listado de genes duplicados de *S. cerevisiae* que forman parte de alguno de los 55 bloques descritos por Seoighe y Wolfe (1999b). Por tanto, este análisis comprende únicamente los genes que supuestamente son resultado de la duplicación genómica ancestral.

<sup>c</sup> Sólo se muestran los valores de  $\chi^2$  significativos al 5%, con respecto al porcentaje del total de las enzimas del metabolismo.

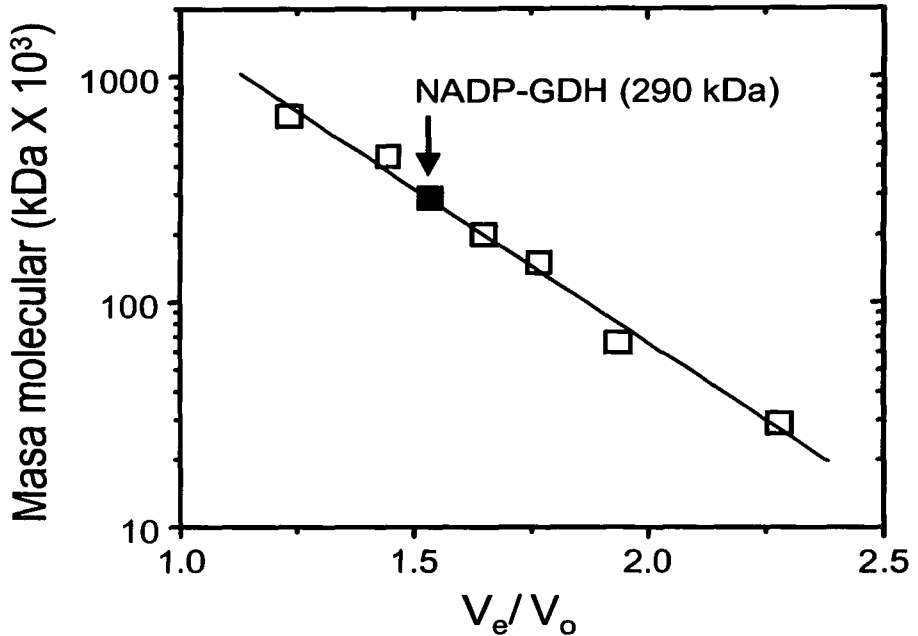
Figura 6



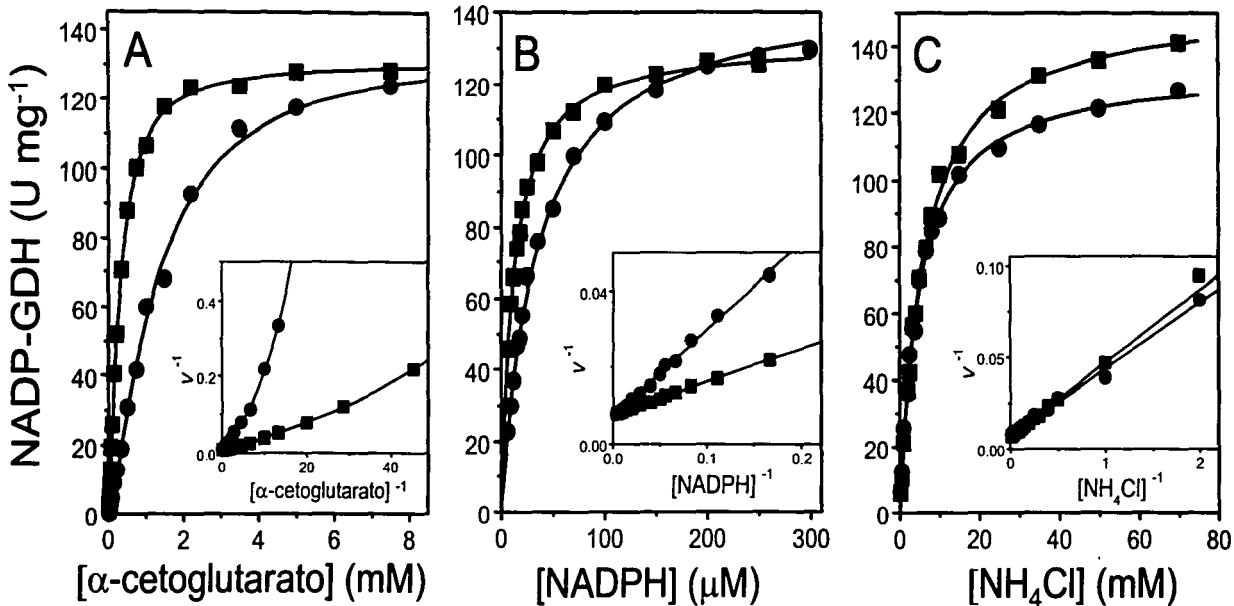
TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Figura 6. Caracterización electroforética de las NADP-GDHs de *S. cerevisiae*.** A, Las proteínas purificadas (1  $\mu$ g) fueron sometidas a electroforesis en gel desnaturalizante de acrilamida (10%) con SDS. B, Las muestras (2  $\mu$ g) fueron analizadas por electroforesis de proteínas nativas en gel de acrilamida (5%). Gdh1p fue purificado de la cepa CLA14-11 (*gdh1 $\Delta$  gdh3 $\Delta$  lp2 $\mu$ -GDH1*), Gdh3p proviene de la cepa CLA 14-22 (*gdh1 $\Delta$  gdh3 $\Delta$  lp2 $\mu$ -GDH3*), mientras que GDH-wt es la muestra purificada de una cepa silvestre (CLA4) que expresa ambos genes.

Figura 7



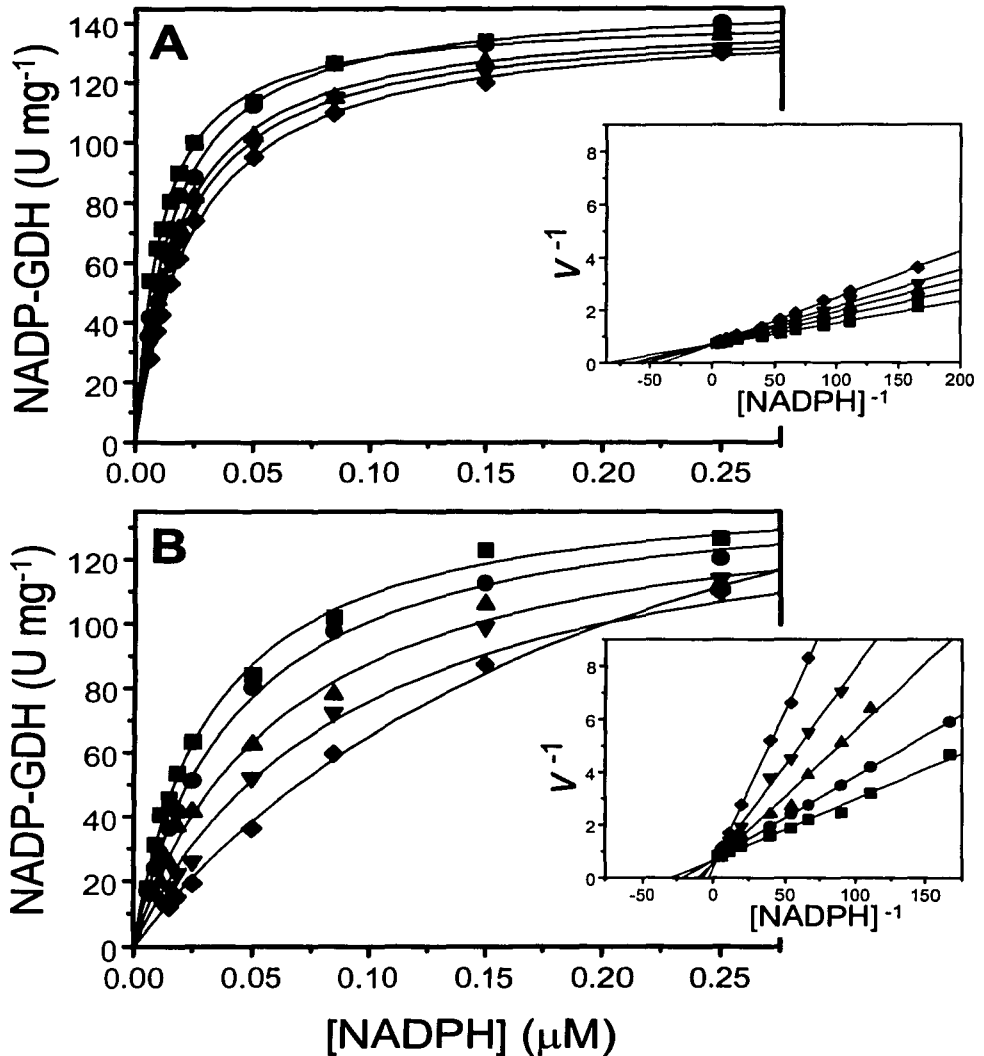
**Figura 7. Forma oligomérica de las NADP-GDHs de *S. cerevisiae*.** La masa molecular nativa de las muestras purificadas fue determinada por cromatografía de filtración en gel (Sephacryl S-300). La columna fue calibrada con marcadores de masa molecular de 29 a 700 kDa. El único pico con actividad enzimática eluyó en un volumen correspondiente a los  $290 \pm 10$  kDa, para las tres muestras purificadas (ver Cuadro 3). La forma oligomérica con actividad enzimática es el hexámero, considerando que la masa molecular de los monómeros codificados por *GDH1* y *GDH3* corresponde a 51 y 46 kDa, respectivamente.



**Figura 8. Análisis cinético comparativo de Gdh1p y Gdh3p.** Los gráficos muestran la dependencia de la velocidad de la reacción (aminación reductiva) por la concentración de  $\alpha$ -cetoglutarato (A), NADPH (B) y amonio (C). Las reacciones fueron ensayadas en Tris 100 mM (pH 7.2) a 25 °C. Símbolos: ■, enzima  $\alpha_6\text{Gdh1p}$ ; ●, enzima  $\alpha_6\text{Gdh3p}$ .

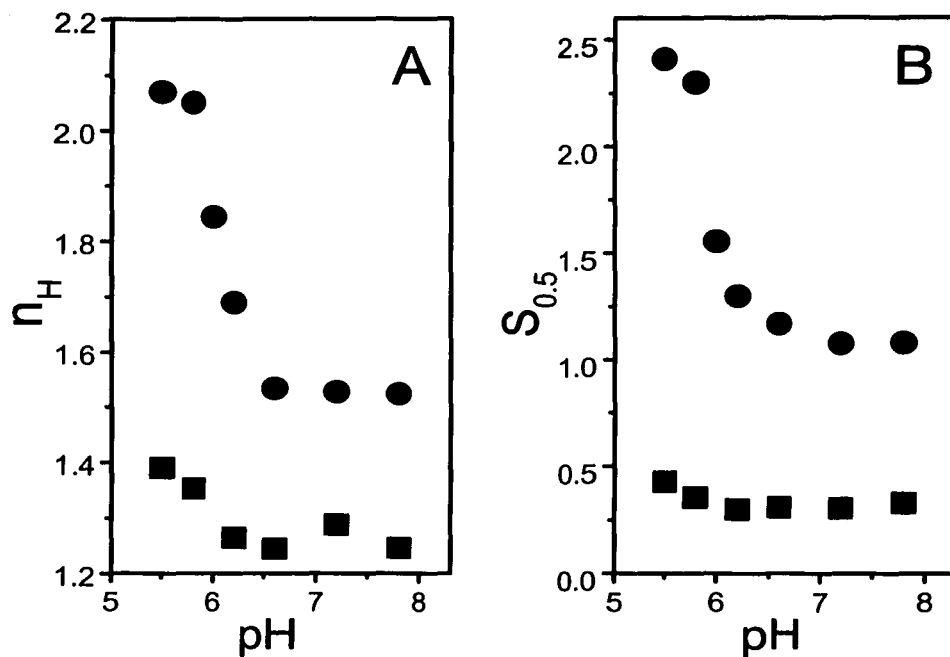
Figura 8

Figura 9



**Figura 9. Inhibición competitiva de las NADP-GDHs por fosfato inorgánico.** La reacción fue medida a concentraciones crecientes de NADPH y saturantes de amonio (50 mM) y  $\alpha$ -cetoglutarato (8 mM), en 100 mM Tris, pH 7.2. Las concentraciones de fosfato de sodio usadas fueron: ■, control; ●, 10 mM; ▲, 25 mM; ▼, 50 mM; ◆, 100 mM. Gráficos: **A**,  $\alpha_6\text{Gdh1p}$ ; **B**,  $\alpha_6\text{Gdh3p}$ .

Figura 10



**Figura 10. Comportamiento alostérico de Gdh1p y Gdh3p.** Los gráficos muestran la dependencia de  $n_H$  (A) y  $S_{0.5}$  (B) por el pH de la reacción, que fue ensayada en ácido acético 25 mM, MES 25 mM, Tris 50 mM, a 25 °C. *Simbolos:* ■, enzima  $\alpha_6$ Gdh1p; ●, enzima  $\alpha_6$ Gdh3p.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Figura 11

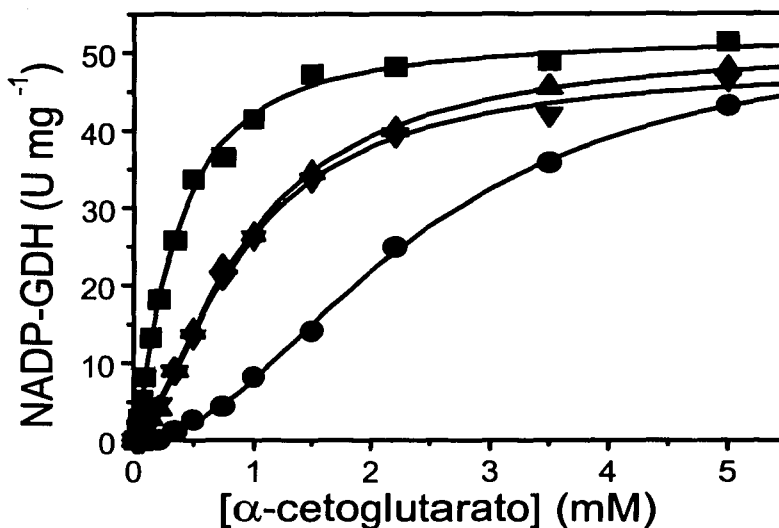


Figura 11. Comportamiento alostérico de la NADP-GDH purificada de una cepa silvestre que expresa simultáneamente *GDH1* y *GDH3*. La reacción fue ensayada en ácido acético 25 mM, MES 25 mM, Tris 50 mM (pH 5.8) a 25 °C. Símbolos: ■, enzima  $\alpha_6$ Gdh1p; ●, enzima  $\alpha_6$ Gdh3p; ▲, NADP-GDH de la cepa silvestre (CLA4); ▼,  $\alpha_6$ Gdh1p +  $\alpha_6$ Gdh3p (75% + 25%, respectivamente).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Figura 12

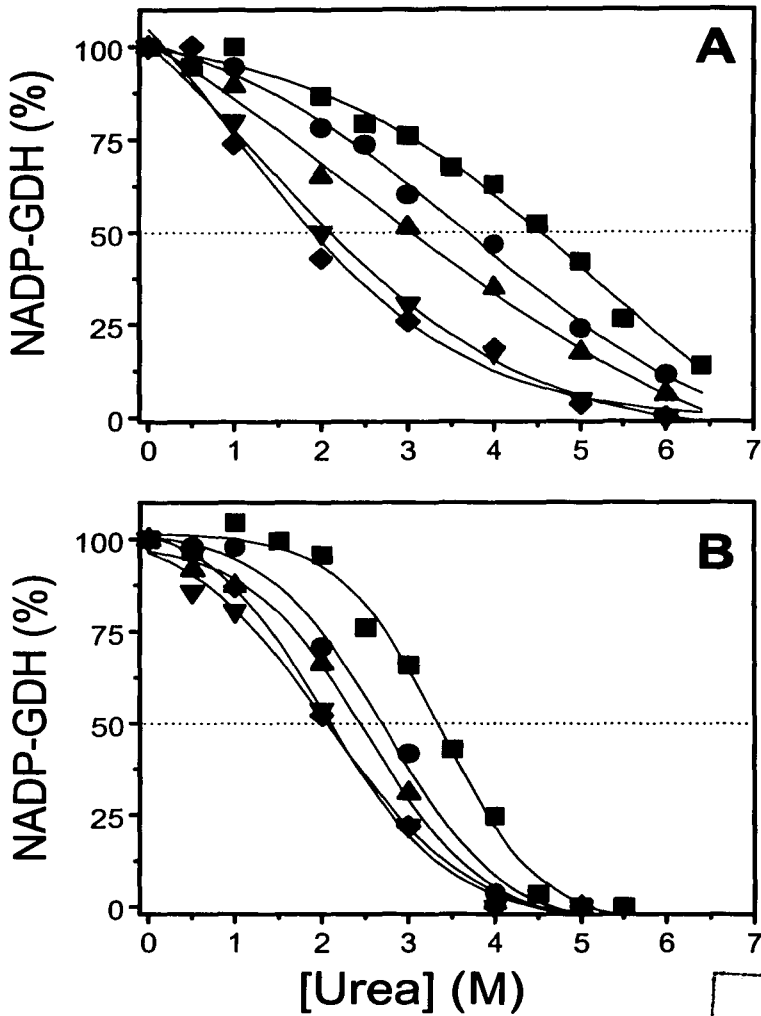
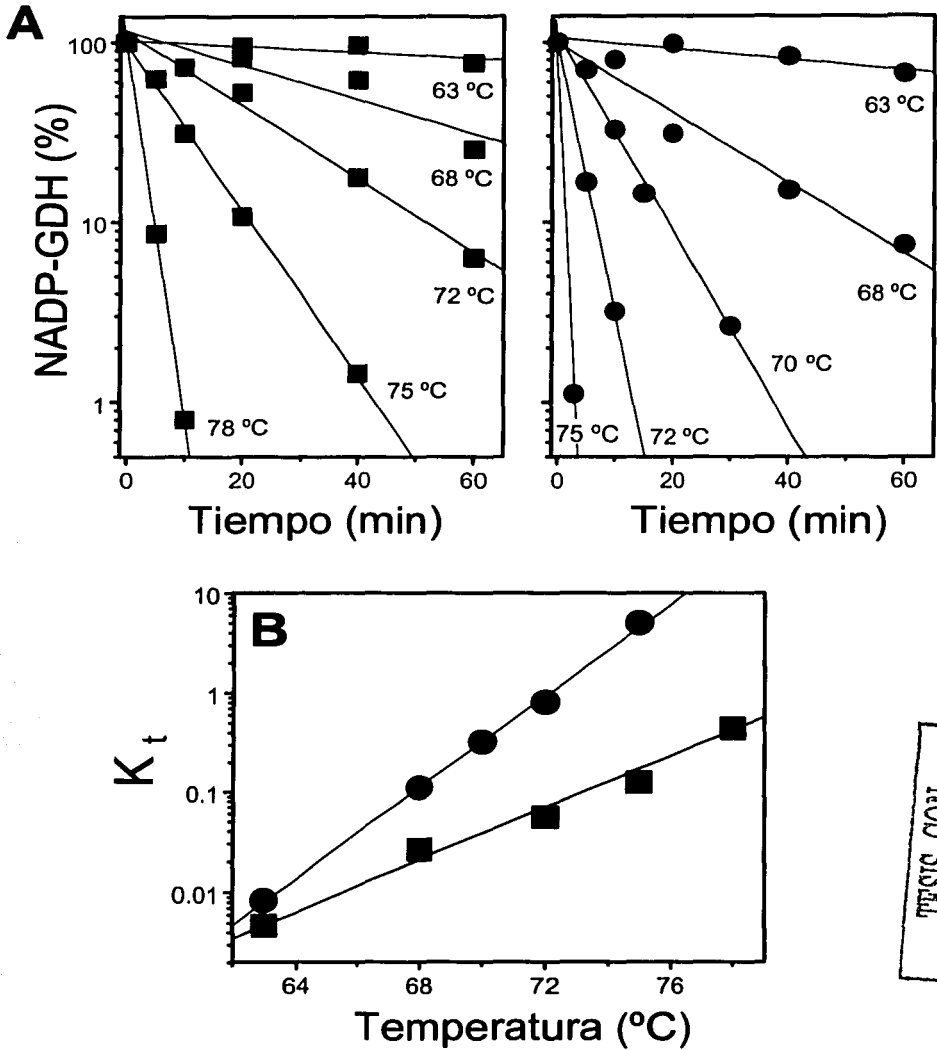


Figura 12. Desnaturalización química de las NADP-GDHs. Las proteínas purificadas fueron incubadas a diferentes concentraciones de urea. Después de un tiempo determinado, se midió la actividad enzimática, la cual se reporta como el porcentaje del valor inicial. Los *simbolos* corresponden al tiempo de incubación: ■, 20 h; ●, 50 h; ▲, 72 h; ▼, 95 h; ◆, 115 h. Gráficos: A,  $\alpha_6\text{Gdh1p}$ ; B,  $\alpha_6\text{Gdh3p}$ .

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

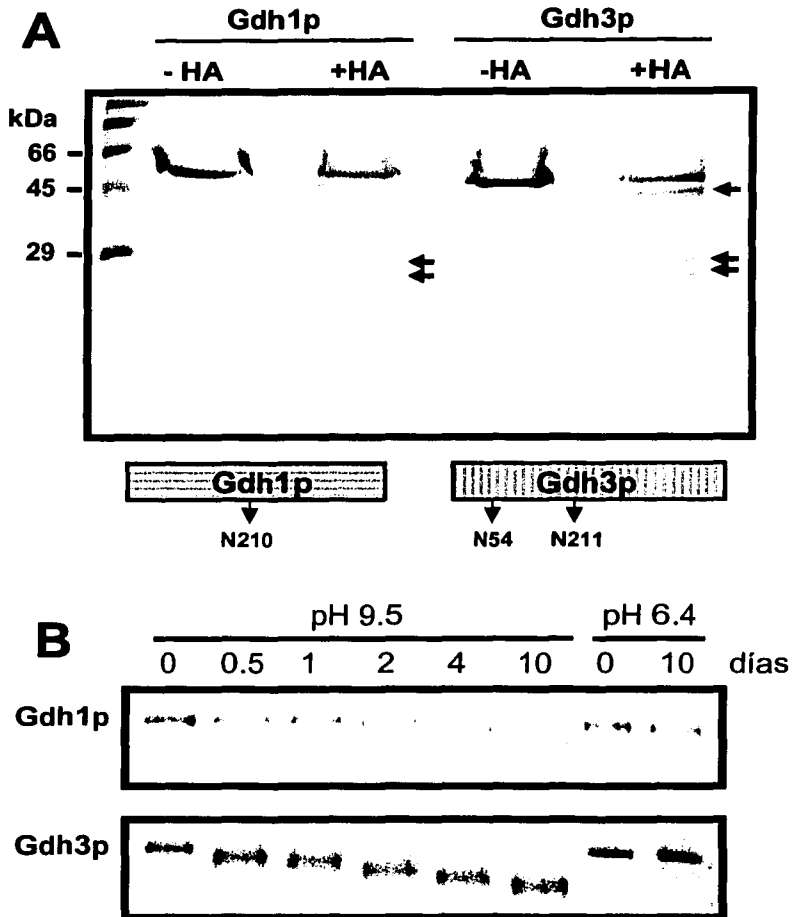
Figura 13



**Figura 13. Inactivación térmica de las NADP-GDHs.** **A**, las proteínas purificadas fueron incubadas a diferentes temperaturas. Después de un tiempo determinado, las muestras fueron enfriadas en hielo y se midió la actividad enzimática. Ésta se reporta como el porcentaje del valor inicial. Las pendientes indican las velocidades de inactivación térmica ( $K_t$ ) a una temperatura dada. **B**, gráfico de las velocidades de inactivación en función a la temperatura. Las pendientes indican el coeficiente de inactivación térmica para cada proteína. *Símbolos*: ■,  $\alpha_6\text{Gdh1p}$ ; ●,  $\alpha_6\text{Gdh3p}$ .

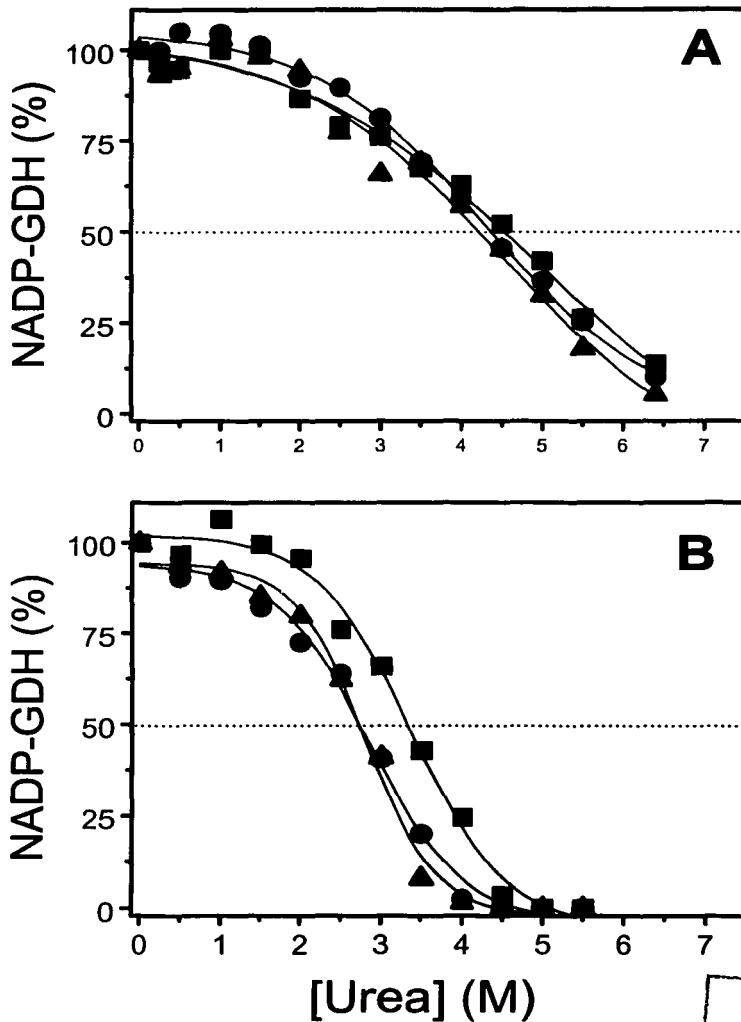
TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Figura 14



**Figura 14. Evaluación de la susceptibilidad a la desamidación espontánea. A,** corte con hidroxilamina. Las proteínas purificadas fueron incubadas a una concentración de  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  en amortiguador de digestión (hidroxilamina 2 M, Tris-HCl 200 mM, pH 9) a  $45^\circ\text{C}$ . Después de 4 horas de incubación, la reacción fue detenida con amortiguador de electroforesis 5X, y las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles desnaturalizantes (SDS) teñidos con azul de Coomassie. **B,** cambio en la carga neta. Las proteínas fueron incubadas a una concentración de  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  en Tris-HCl 100 mM a  $37^\circ\text{C}$ . Después de los tiempos que se indican, las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles nativos (5%) teñidos con azul de Coomassie.

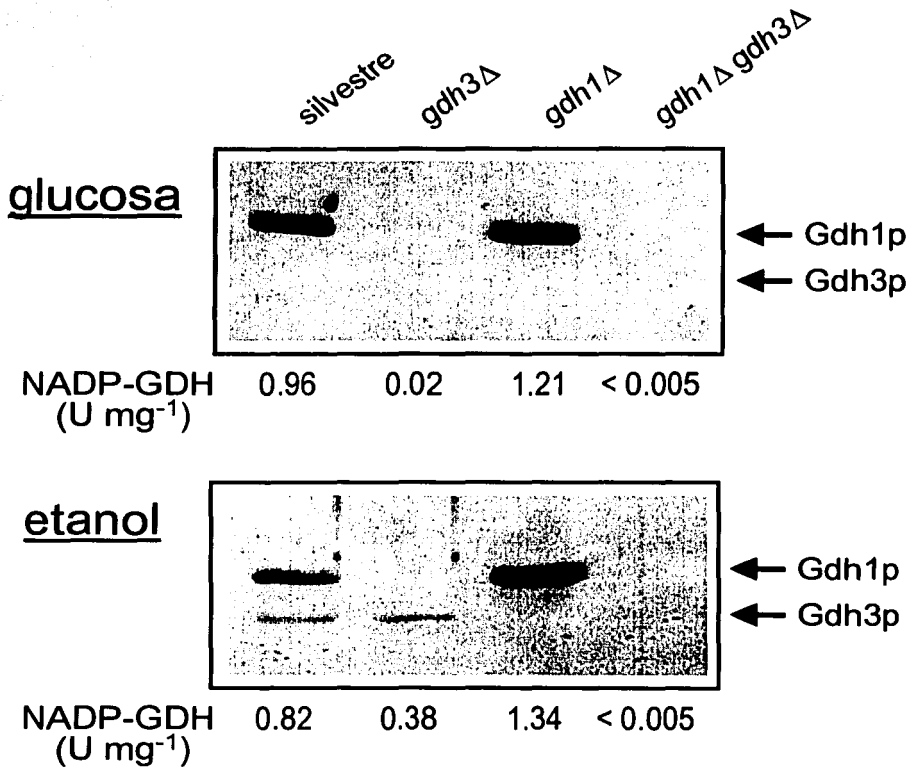
Figura 15



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

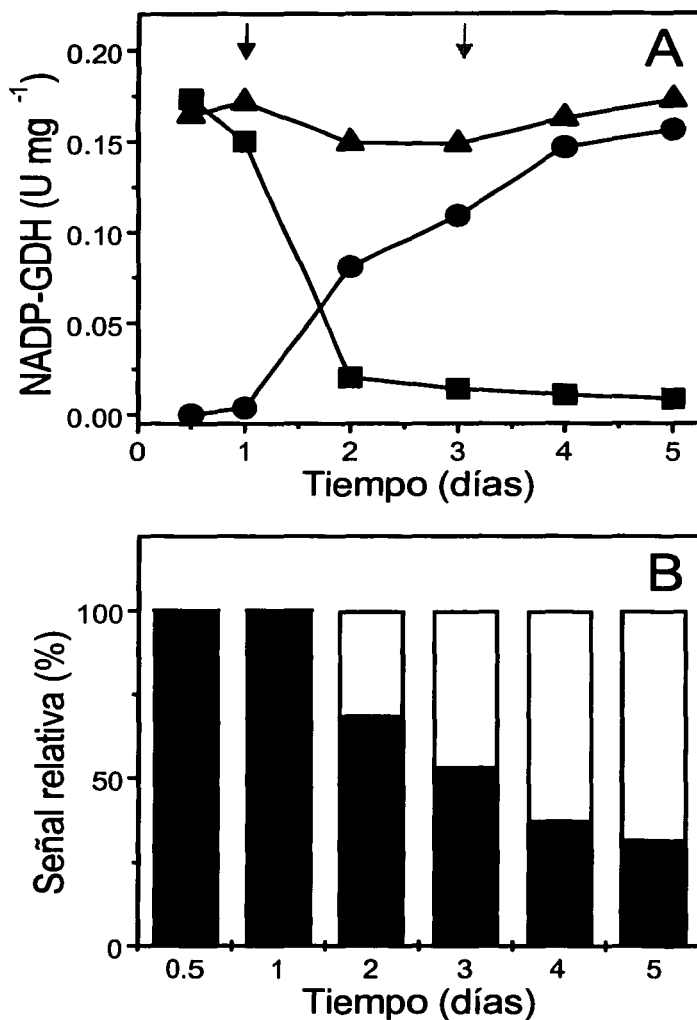
**Figura 15. Estabilidad de las proteínas tratadas por incubación prolongada a pH alcalino.** Las proteínas fueron incubadas a una concentración de  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  en Tris-HCl 100 mM (pH 9.5) a  $37^\circ\text{C}$ . Después de los tiempos que se indican, se midió la estabilidad de las proteínas mediante la incubación a diferentes concentraciones de urea durante 20 hrs. La actividad enzimática se reporta como el porcentaje del valor inicial. Los símbolos corresponden al tiempo de incubación a pH alcalino: ■, control (10 días, pH 6.4); ●, 2 días; ▲, 8 días. Gráficos: A,  $\alpha_6\text{Gdh1p}$ ; B,  $\alpha_6\text{Gdh3p}$ .

Figura 16



**Figura 16. Efecto del carbono sobre la expresión de las NADP-GDHs.** Las células fueron crecidas en medio mínimo con glucosa o con etanol, y fueron cosechadas durante el crecimiento exponencial. La actividad NADP-GDH fue determinada en los extractos crudos, mismos que fueron analizados por inmunorélicas tipo *Western* (sntisuero-Gdh1p) de los geles de electroforesis desnaturalizante con SDS. El análisis densitométrico normalizado de estas réplicas reveló que, en la cepa silvestre crecida en etanol, 75% de la señal corresponde a Gdh1p, mientras que el 25% restante es Gdh3p.

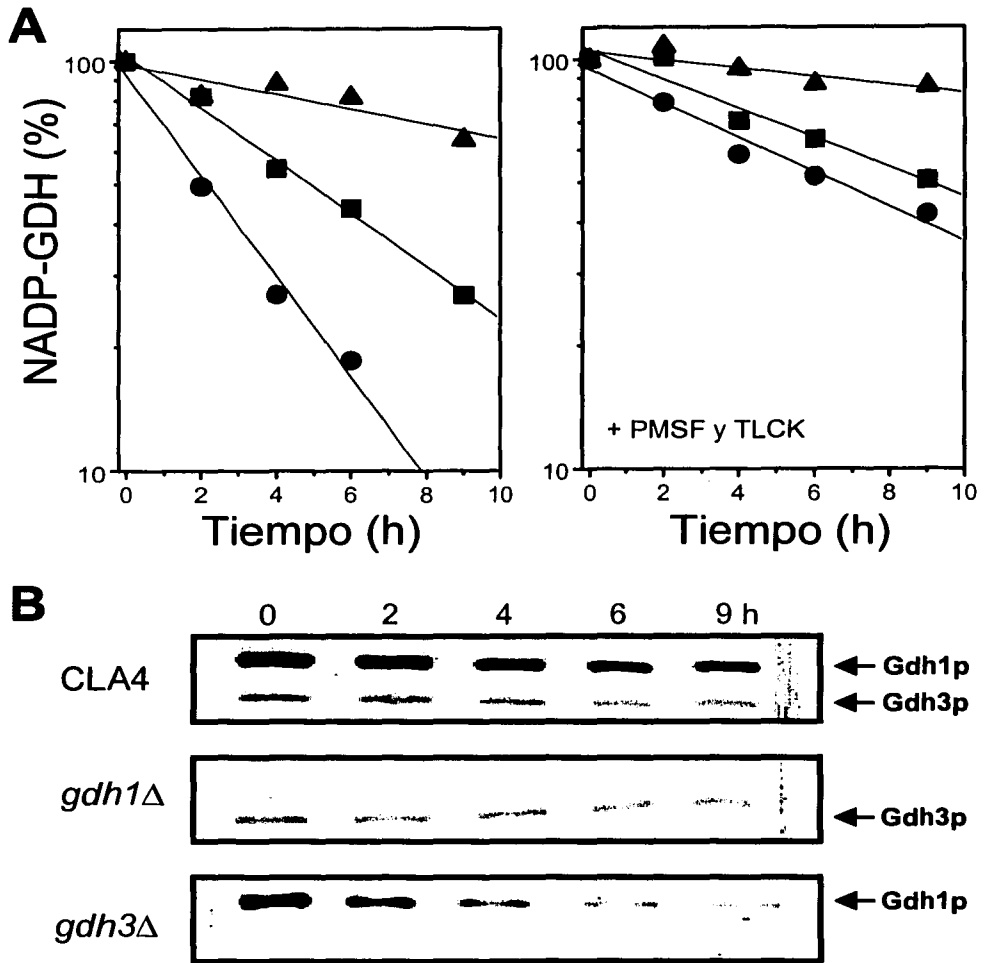
Figura 17



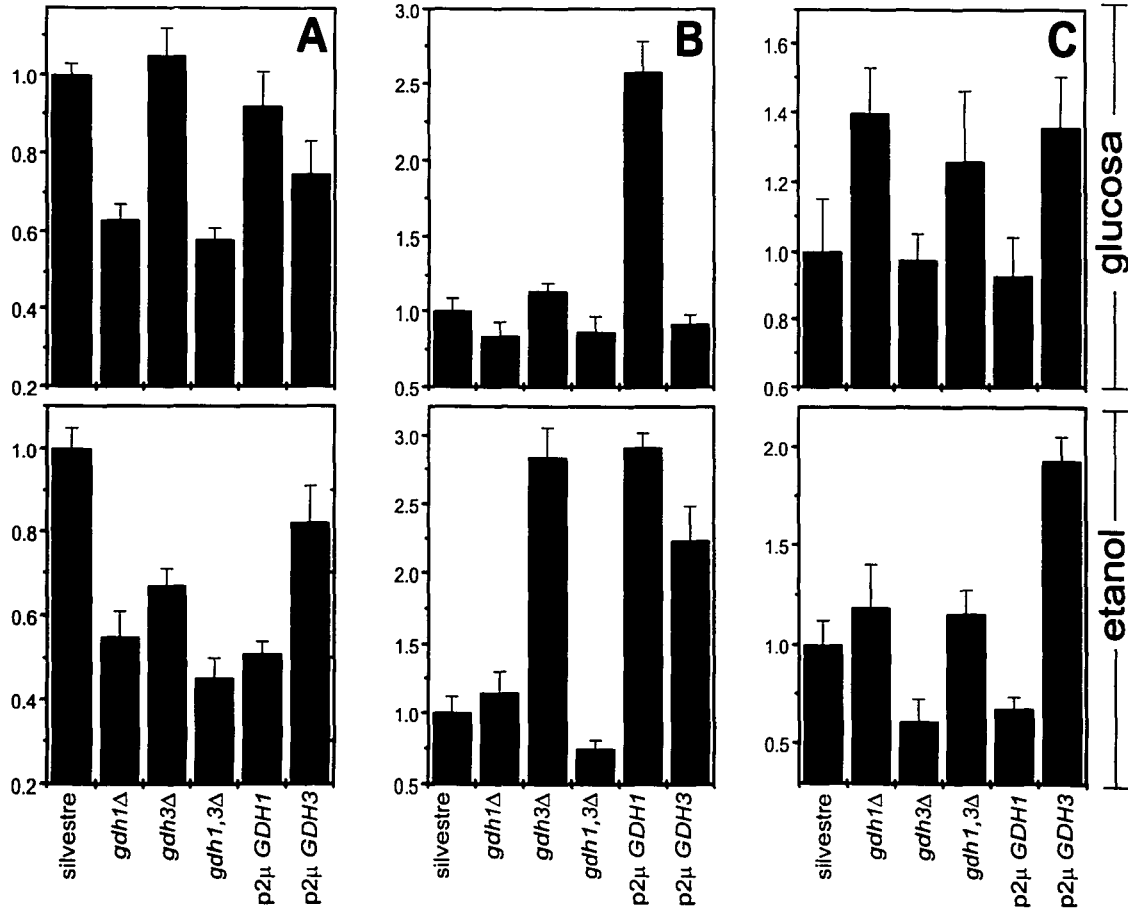
**Figura 17. Expresión de las NADP-GDHs en cultivos prolongados en medio rico YPD.** Las células fueron cosechadas durante las diferentes fases del cultivo. **A**, se muestra la actividad NADP-GDH de los extractos. La *flecha oscura* indica las fases iniciales del crecimiento diáuxico (la glucosa es consumida), la *flecha clara* indica el inicio de la fase estacionaria (el etanol es consumido). *Simbolos*: ●, *gdh3*Δ; ■, *gdh1*Δ; ▲, ceja silvestre. **B**, la proporción de cada isoenzima en los extractos de la ceja silvestre fue determinada mediante el análisis densitométrico normalizado de las inmunorélicas tipo *Western*.

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Figura 18



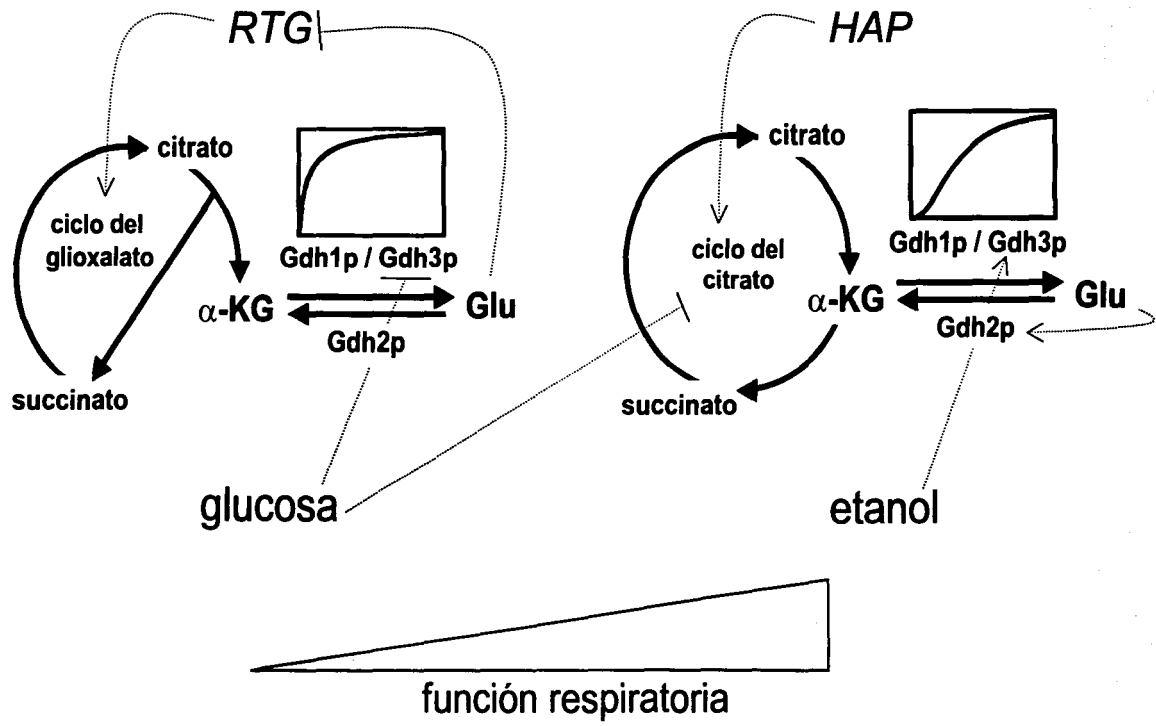
**Figura 18. Efecto de la privación de glucosa sobre la expresión de Gdh1p y de Gdh3p.** Las células fueron crecidas en medio mínimo con glucosa, cosechadas durante el crecimiento logarítmico y resuspendidas al tiempo cero en medio de privación de carbono con o sin inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM y TLCK 0.13 mM). **A**, porcentaje de la actividad NADP-GDH al tiempo cero de la privación de glucosa. **B**, inmunoréplicas tipo Western con antisuero-Gdh1p. Simbolos: ▲, silvestre; ■, *gdh1Δ gdh3Δ* /pCEN GDH1; ●, *gdh1Δ gdh3Δ* /pCEN 5'GDH1-GDH3.



**Figura 19. Caracterización fisiológica de las mutantes.** En todos los casos se muestran los valores relativos a la cepa silvestre. **A**, velocidad de crecimiento. **B**, actividad específica NAD-GDH (catabólica). **C**, concentración intracelular de  $\alpha$ -cetoglutarato. Las cepas fueron crecidas en medio mínimo suplementado con glucosa (gráficos superiores) o etanol (gráficos inferiores), y cosechadas durante el crecimiento exponencial. Cepas: CLA11-00 (silvestre /*p2*μ-Ø), CLA 13-00 (*gdh1*Δ /*p2*μ-Ø), CLA 12-00 (*gdh3*Δ /*p2*μ-Ø), CLA 14-00 (*gdh1*Δ *gdh3*Δ /*p2*μ-Ø), CLA 14-11 (*gdh1*Δ *gdh3*Δ /*p2*μ-*GDH1*), CLA 14-22 (*gdh1*Δ *gdh3*Δ /*p2*μ-*GDH3*).

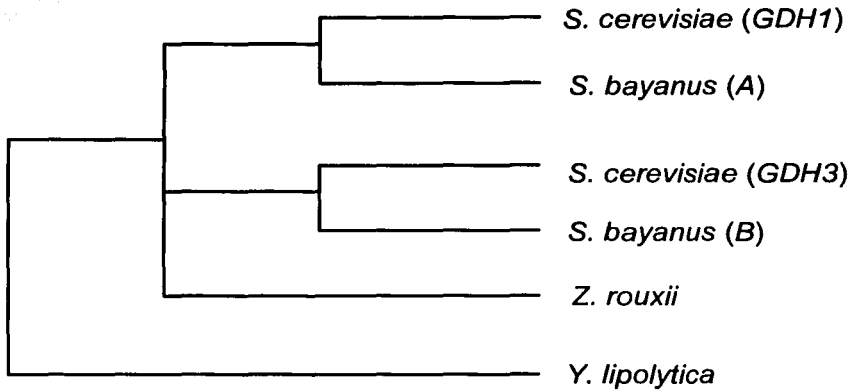


TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN



**Figura 20. Regulación metabólica de las NADP-GDHs de *S. cerevisiae*.** Cuando las células crecen en una fuente de carbono fermentable, como la glucosa, las enzimas del ciclo del citrato que consumen  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) se encuentran reprimidas, mientras que el ciclo del glioxalato está activado por el sistema RTG. En esta condición, la síntesis de glutamato (Glu) depende principalmente de Gdh1p, dada la represión de GDH3 por glucosa. Cuando la fuente de carbono es no fermentable, las enzimas del ciclo del citrato se activan por la acción del sistema HAP. En esta condición, la vía NADP-GDH es modulada a partir de la expresión de GDH3, cuyo producto muestra cooperatividad en su cinética por  $\alpha$ -KG. De esta manera, sólo hay biosíntesis de Glu cuando el metabolismo energético está garantizado por un exceso de intermediarios del ciclo del citrato.

Figura 21



**Figura 21. Cladograma de las secuencias de las GDHs de levaduras filogenéticamente relacionadas.** Las secuencias parciales corresponden a la región N-terminal, y fueron deducidas a partir de las secuencias de DNA de la base de datos de Génolevures, con números de acceso AS0AA004C04DP1 (*S. bayanus*, A), AS0AA030B03DP1 (*S. bayanus*, B), AR0AA015G12TP1 (*Zygosaccharomyces rouxii*), AW0AA009C04T1 (*Yarrowia lipolytica*). El porcentaje de identidad entre *GDH1* y su ortólogo en *S. bayanus* (A) es de 96%, en un traslapo de 159 aminoácidos; mientras que entre *GDH3* y *S. bayanus* (B) hay una identidad del 91% de 316 aminoácidos traslapados. Las secuencias fueron alineadas con el programa ClustalW (1.81).

## CONCLUSIONES

- 1. Las dos NADP-GDHs de *S. cerevisiae*, codificadas por *GDH1* y *GDH3*, son proteínas estructuralmente redundantes que tienen diferentes propiedades bioquímicas y cinéticas.** Las isoenzimas estudiadas son diferentes en su afinidad por  $\alpha$ -cetoglutarato y su inhibición competitiva por fosfato inorgánico. La NADP-GDH codificada por *GDH3* exhibe un comportamiento cooperativo marcado, lo cual sugiere una regulación alostérica *in vivo* de esta isoforma. Las isoenzimas también difieren en su estabilidad *in vitro*.
- 2. La expresión relativa de Gdh1p y Gdh3p depende de la concentración y la naturaleza de la fuente de carbono del medio.** La actividad dependiente de Gdh1p se mantiene constante con respecto a los cambios en la fuente de carbono, mientras que Gdh3p sólo está presente en células crecidas en fuentes de carbono no fermentables. Además, Gdh1p es susceptible a la proteólisis desencadenada por la privación de carbono en el medio, mientras que Gdh3p escapa a dicha inactivación. Por otra parte, los productos de *GDH1* y *GDH3* pueden ensamblarse en forma de hexámeros híbridos; las propiedades alostéricas de los heterómeros dependen de la presencia relativa de los diferentes monómeros.
- 3. Las dos NADP-GDHs tienen funciones no redundantes *in vivo*: sólo con la presencia de ambas se garantiza un equilibrio en la biosíntesis de glutamato y el consumo de  $\alpha$ -cetoglutarato.** Cuando las levaduras crecen mediante la fermentación de glucosa, la actividad dependiente de Gdh1p constituye la vía principal para la biosíntesis de glutamato. Sin embargo, la presencia de ambas NADP-GDHs es indispensable para un crecimiento respiratorio normal en medios de cultivo con etanol. La deficiencia respiratoria de las cepas interrumpidas en *GDH3*, así como de las que sobreexpresan *GDH1*, se debe a un consumo desequilibrado de  $\alpha$ -cetoglutarato.

Estos resultados indican que la conservación y diversificación funcional de dos GDHs anabólicas responde a una especialización en la regulación de la vía NADP-GDH al metabolismo facultativo. El fenómeno aquí descrito podría formar parte del remodelamiento que necesariamente tuvo que haber ocurrido durante el proceso de adaptación al metabolismo anaerobio facultativo en *S. cerevisiae*.

## PERSPECTIVAS

### 1. Estudio bioquímico y fisiológico de las NADP-GDHs de *S. cerevisiae*

Como se discutió en este trabajo, *GDH1* y *GDH3* codifican para dos proteínas con un alto porcentaje de identidad en su secuencia de aminoácidos, no obstante se ha demostrado que difieren en aspectos tales como su afinidad por sustratos, su inhibición por fosfato, su comportamiento alostérico y su estabilidad *in vitro*. Por lo anterior pueden usarse como un buen modelo para emprender estudios comparativos sobre algunos aspectos de la estructura y la función de proteínas. El hecho de contar con estos genes en una colección de vectores monocopia y multicopia de levadura permite abordar fácilmente estos problemas, mediante el uso de mutagénesis dirigida a sitios específicos de las secuencias.

- Las isoenzimas migran distinto en geles desnaturalizantes, pese a predecirse tamaños iguales por la secuencia deducida de aminoácidos ¿Existe un procesamiento postraduccional específico para Gdh3p? De ser así, ¿cuál es su naturaleza, y a qué señal se debe la especificidad de este fenómeno?
- Los homohexámeros formados con Gdh3p exhiben una cooperatividad marcada, a diferencia de aquellos ensamblados con monómeros de Gdh1p ¿A qué propiedad estructural se debe la diferencia en el comportamiento alostérico de estas isoenzimas? De identificarse esta diferencia, ¿puede extrapolarse a los diferentes patrones de cooperatividad que han mostrado las GDHs hexaméricas de otros hongos y de bacterias?
- Los resultados de este trabajo sugieren que las NADP-GDHs de levadura son susceptibles a la desamidación espontánea *in vitro*. La velocidad de desamidación parece ser diferente entre las isoenzimas, debido a la presencia de un residuo lábil de Asn que sólo está presente en Gdh3p. Más aún, la supuesta desamidación parece alterar la estabilidad de la proteína *in vitro*. ¿Se debe lo anterior directamente al fenómeno de desamidación? ¿Cuál es el mecanismo molecular que lleva a dicha desestabilización? Por otra parte, vale la pena preguntarse si esta diferencia en las velocidades de desamidación tiene consecuencias en la vida media de estas isoenzimas *in vivo*.

- Ante una privación de la fuente de carbono del medio, Gdh1p es inactivado por proteólisis, mientras que Gdh3p escapa a este proceso. Dado que Gdh1p tiene en su secuencia un sitio para la fosforilación por cinasa dependiente de AMP cíclico, cabe preguntarse si la presencia de este compuesto en la célula forma parte de una vía de señalización que termina en la proteólisis específica de esta isoforma. De no ser el caso, ¿cuál es la señal que resulta en una proteólisis diferencial de las NADP-GDHs en respuesta a la privación de carbono?
- Existen enzimas y factores transcripcionales que están estrechamente ligados con la encrucijada metabólica que representa la asimilación de amonio: *GLT1*, *GDH2*, sistema *RTG*, sistema *HAP*. A partir del modelo de regulación metabólica de la GDH anabólica, discutido en este trabajo, puede predecirse el comportamiento de algunas mutantes bajo diferentes condiciones de fuente de carbono en el medio.
- Los resultados de este trabajo indican que la duplicación y diversificación funcional de la vía NADP-GDH de *S. cerevisiae* facilita la regulación metabólica necesaria para el crecimiento facultativo. El anaerobio facultativo *S. bayanus* también tiene dos GDHs anabólicas, mientras que sólo se encuentra un gen para esta actividad enzimática en el aerobio estricto *K. lactis*. ¿Coincide la duplicación de estos genes con el origen de las habilidades facultativas en del linaje de los hemiascomicetos? ¿La conservación de dos GDHs anabólicas en otras levaduras responde a una especialización metabólica similar a la que aquí se ha descrito para *S. cerevisiae*?

## 2. Estudio fisiológico global de la redundancia génica en *S. cerevisiae*

Las consideraciones evolutivas presentadas en la discusión de este trabajo de Tesis han permitido plantear una serie de preguntas que bien vale la pena seguir estudiando. La posibilidad de que una fracción de la redundancia génica presente en *S. cerevisiae* tenga que ver con un remodelamiento mayor del metabolismo de esta levadura en el desarrollo de habilidades facultativas seguirá en el terreno de lo especulativo, hasta que no se lleven a cabo estudios globales y sistemáticos sobre los genes duplicados de este organismo. Las herramientas que existen para el análisis funcional del genoma de la levadura hacen de este organismo un buen modelo para evaluar el valor de la redundancia génica en términos adaptativos.

- Cerca del 29% de los genes de *S. cerevisiae* (1,655 ORFs) tienen un homólogo en el mismo genoma. Mediante el análisis global de la expresión de estos genes bajo diferentes condiciones de fuente de carbono y concentración de oxígeno en el medio, se puede evaluar cuál es la fracción de parálogos que están regulados de manera diferencial en estas situaciones fisiológicas.
- El corto tiempo generacional de este microorganismo permite medir la adecuación de mutantes a través de varios cientos de generaciones. Por otra parte, existe una colección de cepas interrumpidas en cada uno de los ORFs de *S. cerevisiae*, mismas que portan una marca molecular única que permite identificarla por hibridación de DNA en una mezcla de mutantes. Utilizando esta estrategia, se puede evaluar fácilmente cuál es la fracción de parálogos cuya mutación resulta en una pérdida de adecuación diferencial según las condiciones fisiológicas prevaletentes.

## RESULTADOS PUBLICADOS

El documento que enseguida se presenta se basa en una parte sustancial de los resultados discutidos en este trabajo de Tesis. En el artículo, se reporta la caracterización bioquímica y fisiológica de las isoenzimas NADP-GDH de *S. cerevisiae*, codificadas por *GDH1* y *GDH3*. Las proteínas purificadas mostraron diferencias en sus propiedades alostéricas y en sus velocidades de consumo de  $\alpha$ -cetoglutarato. El análisis de la expresión relativa de estas proteínas, reveló que la expresión de *GDH1* y *GDH3* se encuentra regulada de manera diferente y dependiente de la naturaleza y concentración de la fuente de carbono. Más aún, el estudio fisiológico de las mutantes que carecen o que expresan *GDH1* o *GDH3* en multicopia sugirió que estos genes juegan papeles no redundantes.

Los resultados de este estudio indican que la regulación coordinada de las enzimas codificadas por *GDH1*, *GDH2* y *GDH3* resulta en la biosíntesis de glutamato sin comprometer el uso balanceado de  $\alpha$ -cetoglutarato, bajo condiciones de crecimiento respiratorio. Por tanto, se discute la relevancia de la vía NADP-GDH duplicada como un mecanismo que modula el uso de un intermediario del ciclo del citrato para una vía anabólica, en las condiciones de metabolismo fermentativo y respiratorio que se dan en un organismo facultativo como *S. cerevisiae*.

**NADP-Glutamate Dehydrogenase Isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae***

PURIFICATION, KINETIC PROPERTIES, AND PHYSIOLOGICAL ROLES\*

Received for publication, August 20, 2001, and in revised form, September 17, 2001  
Published, JBC Papers in Press, September 18, 2001, DOI 10.1074/jbc.M107986200

Alexander DeLuna†, Amaranta Avendaño, Lina Riego, and Alicia González§

From the Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, México D.F. 04510, México

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, two NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenases (NADP-GDHs) encoded by *GDH1* and *GDH3* catalyze the synthesis of glutamate from ammonium and  $\alpha$ -ketoglutarate. The *GDH2*-encoded NAD<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase degrades glutamate producing ammonium and  $\alpha$ -ketoglutarate. Until very recently, it was considered that only one biosynthetic NADP-GDH was present in *S. cerevisiae*. This fact hindered understanding the physiological role of each isoenzyme and the mechanisms involved in  $\alpha$ -ketoglutarate channeling for glutamate biosynthesis. In this study, we purified and characterized the *GDH1*- and *GDH3*-encoded NADP-GDHs; they showed different allosteric properties and rates of  $\alpha$ -ketoglutarate utilization. Analysis of the relative levels of these proteins revealed that the expression of *GDH1* and *GDH3* is differentially regulated and depends on the nature of the carbon source. Moreover, the physiological study of mutants lacking or overexpressing *GDH1* or *GDH3* suggested that these genes play nonredundant physiological roles. Our results indicate that the coordinated regulation of *GDH1*-, *GDH3*-, and *GDH2*-encoded enzymes results in glutamate biosynthesis and balanced utilization of  $\alpha$ -ketoglutarate under fermentative and respiratory conditions. The possible relevance of the duplicated NADP-GDH pathway in the adaptation to facultative metabolism is discussed.

Like most free living microorganisms, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* possesses amino acid biosynthetic pathways that allow the cell to use ammonium as sole nitrogen source. Ammonium utilization occurs exclusively via its incorporation into glutamate and glutamine (1), a process that can be achieved by two metabolic routes. One of them is constituted by the concerted action of glutamine synthetase and the *GLT1*-encoded glutamate synthase (2, 3). The other pathway is mediated by the NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase (NADP-GDH)<sup>1</sup> (EC 1.4.1.4), a broadly distributed enzyme that

catalyzes the reductive amination of  $\alpha$ -ketoglutarate to form glutamate (4, 5). In *S. cerevisiae*, two genes (*GDH1* and *GDH3*) have been described whose products constitute NADP-GDH isoenzymes (6). Glutamate catabolism is achieved through a reaction catalyzed by a different but related enzyme, the *GDH2*-encoded NAD<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase (NAD-GDH) (EC 1.4.1.2), which determines glutamate degradation to ammonium and  $\alpha$ -ketoglutarate (4, 7, 8).

*S. cerevisiae* is the first microorganism described in which the NADP-GDH activity is encoded by two genes (6); the physiological significance of this apparent redundancy is not clear. When this yeast is grown on glucose and ammonium as carbon and nitrogen sources, *Gdh1p* is the primary pathway for glutamate biosynthesis (6, 9, 10). It has also been shown that *GDH1* expression is regulated by the *HAP* system (11), which is known to control expression of genes involved in carbon metabolism and respiratory function (12). Null *gdh3Δ* mutants show no evident growth phenotype on glucose, and *GDH3*-dependent activity is negligible on this carbon source. Nevertheless, a biosynthetic role was established for *GDH3* in a double *gdh1Δ glt1Δ* mutant that grows on ammonium sulfate as sole nitrogen source by means of *Gdh3p* (6). Moreover, global analysis of transcription suggests that *GDH3* expression is influenced by the general nitrogen control system (13).

*S. cerevisiae* is able to grow using a variety of carbon sources under fermentative and respiratory conditions. This fact has stimulated discussion as to which specific mechanism allows  $\alpha$ -ketoglutarate utilization for glutamate biosynthesis without impairing the integrity of the tricarboxylic acid cycle as an energy-providing system. In this regard, it has been shown that *Klebsiella aerogenes* strains overexpressing their *gdhA* gene coding for the biosynthetic NADP-GDH display an auxotrophy that is interpreted as a limitation for  $\alpha$ -ketoglutarate and succinyl-coenzyme A (14). Accordingly,  $\alpha$ -ketoglutarate modulates NADP-GDH activity so that fluctuations in the intracellular levels of tricarboxylic acid cycle intermediates would regulate glutamate biosynthesis. Indeed, it has been shown that the signal that coordinately regulates carbon and nitrogen metabolism in *Escherichia coli* depends on the intracellular levels of  $\alpha$ -ketoglutarate and glutamine (15). Interestingly, the presence of *Gdh3p* has been found to be increased during diauxic transition in *S. cerevisiae* (16), suggesting a particular role of this enzyme in respiratory metabolism.

To understand the function of the duplicated NADP-GDH pathway present in *S. cerevisiae*, we purified both isoenzymes and studied their biochemical properties. Our results revealed

\* This work was supported in part by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Grant IN212898 and by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grant 31774. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† Recipient of a fellowship and a grant (PAEP-102315) from the Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM.

§ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 52-56225631; Fax: 52-56225630; E-mail: amanajrr@fisiol.unam.mx.

<sup>1</sup> The abbreviations used are: NADP-GDH, NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase; NAD-GDH, NAD<sup>+</sup>-dependent glutamate dehy-

drogenase; MM, minimal medium; YPD, yeast-peptone-dextrose; PCR, polymerase chain reaction; TLCK, N<sup>ω</sup>-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone; MES, 4-morpholineethanesulfonic acid; bp, base pair(s).



43776

## Yeast NADP-Glutamate Dehydrogenase Isoenzymes

TABLE I  
S. cerevisiae strains used in this work

Strain	Relevant genotype	Source
CLA1	MAT <sup>a</sup> GDH1 GDH3 <i>ura3 leu2</i>	Ref. 6
CLA4	MAT <sup>a</sup> GDH1 GDH3 URA3::Ylp5 LEU2::Ylp351	Ref. 6
CLA6	MAT <sup>a</sup> <i>gdh1Δ::URA3 GDH3 LEU2::Ylp351</i>	Ref. 6
CLA7	MAT <sup>a</sup> GDH1 <i>gdh3Δ::LEU2 URA3::Ylp5</i>	Ref. 6
CLA10	MAT <sup>a</sup> <i>gdh1Δ::URA3 gdh3Δ::LEU2</i>	Ref. 6
CLA11	MAT <sup>a</sup> GDH1 GDH3 LEU2::Ylp351 <i>ura3</i>	This study
CLA12	MAT <sup>a</sup> GDH1 <i>gdh3Δ::LEU2 ura3</i>	This study
CLA13	MAT <sup>a</sup> <i>gdh1Δ::kanMX4 GDH3 LEU2::Ylp351 ura3</i>	This study
CLA14	MAT <sup>a</sup> <i>gdh1Δ::kanMX4 gdh3Δ::LEU2 ura3</i>	This study

that Gdh1p and Gdh3p have different allosteric properties and rates of  $\alpha$ -ketoglutarate utilization. The construction of chimerical plasmids harboring combinations of the *GDH1* and *GDH3* promoter and coding regions allowed us to determine that expression of these two genes is differentially modulated by the carbon source. Finally, physiological analysis of mutants lacking or overexpressing *GDH1* or *GDH3* showed that expression of both genes is required to achieve wild-type growth on ethanol. Our results indicate that existence of different NADP-GDH isoenzymes allows the functioning of a regulatory system in which the relative abundance of each isoform modulates the rate at which  $\alpha$ -ketoglutarate is channeled to glutamate biosynthesis.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

## Strains

Table I describes the characteristics of the strains used in the present work. All strains constructed for this study were *LEU2* derivatives of CLA1 (*ura3 leu2*) and thus suited for *URA3* selection. To obtain a *gdh3Δ* mutant, CLA1 was transformed with the *Bgl*II-linearized plasmid pLV6 (6) harboring a 760-bp *GDH3* fragment and the yeast *LEU2* gene, generating strain CLA12 (*GDH1 gdh3Δ ura3*). A *gdh1Δ gdh3Δ ura3* mutant was obtained from CLA12, using the PCR-based gene replacement protocol described by Wach *et al.* (17), with *kanMX4* as a marker. Two deoxyoligonucleotides were designed based on the *GDH1* nucleotide sequence and that of the multiple cloning site present in the pFA6a vector (17). The deoxyoligonucleotide D1 (5'-CAG AAT TTC AAC AAG CTT ACG AAG AAG TTG TCT CCT CTT TGG AAG CGT ACG CTG CAG GTC GAC-3') comprised 45 bp of the 5' region of the *GDH1* coding sequence (+11 to +55), and 18 bp (in boldface type) of the pFA6a multiple cloning site. The deoxyoligonucleotide D2 (5'-AAC ACC GAT ATC ACC AGC TGG CAC GTC AGT GTC ACC AAT GTG ATC GAT GAA TTC GAG CTC G-3') contained 45 bp corresponding to an internal *GDH1* gene fragment (+451 to +495) and 19 bp (in boldface type) from the pFA6a multiple cloning site. Qiagen purified pFA6a DNA was used as template for PCR amplification in a Stratagene Robocycler 40 with the following program: one denaturing cycle for 3-min at 94 °C, followed by 26 cycles of 30-s denaturation at 94 °C, 1-min annealing at 50 °C, and 1-min extension at 72 °C. The 522-bp PCR product obtained was gel-purified and used to transform strain CLA12, generating strain CLA14. A CLA1 *LEU2* derivative was obtained by transforming this strain with plasmid Ylp351, generating strain CLA11. To obtain a *gdh1Δ GDH3 ura3* mutant, the CLA11 strain was transformed with the above mentioned 522-bp PCR product, thus generating CLA13.

Yeast was transformed by the method described by Ito *et al.* (18). Transformants were selected for either leucine prototrophy on minimal medium (MM), or G418 resistance (200 mg/liter) (Life Technologies, Inc.) on yeast extract-peptone-dextrose (YPD)-rich medium.

## Growth Conditions

Strains were routinely grown on MM containing salts, trace elements, and vitamins following the formula of yeast nitrogen base (Difco). Filter-sterilized glucose (2%, w/v) or ethanol (2%, w/v) was used as a carbon source, and 40 mM ammonium sulfate was used as a nitrogen source. Supplements needed to satisfy auxotrophic requirements were added at 0.1 mg/ml. Cells were incubated at 30 °C with shaking (250 rpm).

Construction of Low Copy Number and High Copy Number Plasmids Bearing *GDH1* or *GDH3* Genes

All standard molecular biology techniques were followed as previously described (19). *GDH1* or *GDH3* were PCR-amplified together with

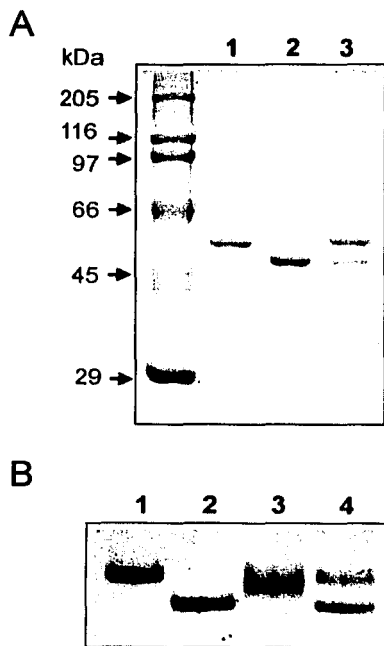


Fig. 1. Purification and electrophoretic characterization of yeast NADP-GDHs. A, SDS-PAGE showing proteins purified to electrophoretic homogeneity from ethanol-grown yeast cultures (see "Experimental Procedures" for purification strategy). Lane 1, Gdh1p (from CLA14-11); lane 2, Gdh3p (from CLA14-22); lane 3, wild-type NADP-GDH (from CLA4). B, purified proteins (2  $\mu$ g) were subjected to native gel electrophoresis (6%) and Coomassie-stained. Lane 1, Gdh1p (from CLA14-11); lane 2, Gdh3p (from CLA14-22); lane 3, wild-type NADP-GDH (from CLA4); lane 4, Gdh1p plus Gdh3p.

their 5' promoter sequence and cloned into either the pRS316 (*CEN6 ARS4 URA3*) low copy number or pRS426 (2 $\mu$  ori *URA3*) high copy number yeast shuttle vectors (20, 21). For *GDH1*, the 2596-bp region between -952 from the start codon and +285 from the stop codon was considered to comprise the full *GDH1* promoter and coding sequences (11). For *GDH3*, a 2646-bp fragment was PCR-amplified, containing the putative regulatory region (-1213 from the start codon) plus the full coding sequence and +48 from the end codon, as reported in the nucleotide sequence of chromosome I from *S. cerevisiae* (22). Deoxyoligonucleotides used for this purpose were S1 (5'-CGC GGG ATC CAG TAG TTC AGC GAC AGA AG-3'), S2 (5'-CGC GCG GAT CCC GAG TAA GGT CAT CAA TAA G-3'), S3 (5'-CGC GGG ATC CTG CCG TTA TAT GAT CTT C-3'), and S4 (5'-CGC GCG GAT CCT ACT ACA TAC ACA GAT AG-3'), generating plasmids pLAM1 (*GDH1* CEN *URA3*), pLAM11 (*GDH1* 2 $\mu$  *URA3*), pLAM2 (*GDH3* CEN *URA3*), and pLAM22 (*GDH3* 2 $\mu$  *URA3*). DNA sequencing was carried out, using the T3/T7 priming sites of pRS316 and pRS426, at the Unidad de Biología Molec-

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

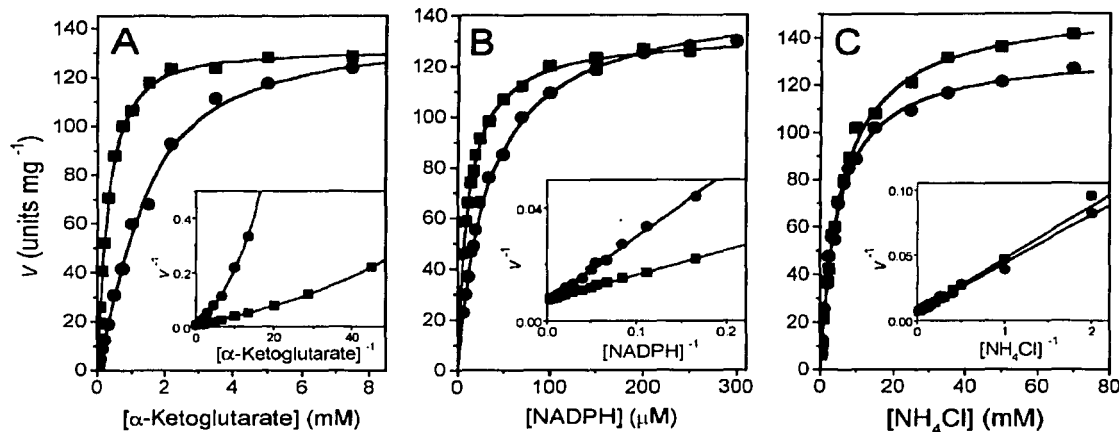


FIG. 2. Comparative kinetic analysis of two NADP-GDH isoenzymes. Plots show the dependence of the relative rate of the reductive amination reaction on the concentration of  $\alpha$ -ketoglutarate (A), NADPH (B), and ammonium (C). Reactions were carried out in 100 mM Tris buffer (pH 7.2) at 25 °C (see "Experimental Procedures"). ■, Gdh1p enzyme; ●, Gdh3p enzyme. Insets represent double reciprocal plots.

ular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Plasmids were subsequently transformed into CLA14 double mutant, and uracil prototrophs were selected, thus generating strains CLA14-1, CLA14-11, CLA14-2, and CLA14-22. Control strains harboring the 2 $\mu$  pRS426 plasmid were constructed by transforming CLA11, CLA12, CLA13, and CLA14, generating strains CLA11-00, CLA12-00, CLA13-00, and CLA14-00, respectively.

#### Construction of GDH1 and GDH3 Chimerical Fusion Plasmids

Fusions containing either the GDH1 promoter and the GDH3 coding sequence or the GDH3 promoter and the GDH1 coding sequence were generated by overlapping PCR amplification. For this purpose, primers S1 and S5 (5'-CTC TGG TTC GCT TGT CAT TTC TTT TTC TTT TIG G-3') were used to obtain a 980-bp product corresponding to the GDH1 5' cognate sequence and the first 19 bp of the GDH3 coding sequence (in boldface type); this was overlapped with the 1431-bp product of primers S4 and S8 (5'-GAC AAG CGA ACC AGA GTT TC-3'), which included the complete GDH3 coding sequence. Similarly, primers S2 and S9 (5'-GAA ATT CTG GCT CTG ACA TTT TTA CTT TTT ACC-3') were used to obtain a 1244-bp product corresponding to the GDH3 5' cognate sequence, together with the first 17 bp of the GDH1 coding sequence (in boldface type), and overlapped with the 1632-bp product of primers S3 and S10 (5'-GTC AGA GCC AGA ATT TCA AC-3'), which included the complete GDH1 coding sequence. The whole procedure led to the generation of the following plasmids: pLAM3 (5'GDH3-GDH1 CEN URA3), pLAM33 (5'GDH3-GDH1 2 $\mu$  URA3), pLAM4 (5'GDH1-GDH3 CEN URA3), and pLAM44 (5'GDH1-GDH3 2 $\mu$  URA3). Constructs were verified by DNA sequencing as described above.

Plasmids were subsequently transformed into the CLA14 double mutant, and uracil prototrophs were selected, generating strains CLA14-3, CLA14-33, CLA14-4, and CLA14-44.

#### NADP-GDH Purification

NADP-GDH activity was purified from ethanol-grown cultures of CLA 14-11 (*gdh1 $\Delta$  gdh3 $\Delta$ pLAM11 (GDH1 2 $\mu$  URA3)*), CLA 14-22 (*gdh1 $\Delta$  gdh3 $\Delta$ pLAM22 (GDH3 2 $\mu$  URA3)*), and the CLA4 wild-type strain. Strains were grown in 10 liters of MM supplemented with ethanol and ammonium sulfate, in a fermentor at the Unidad de Escalamiento, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Cultures were incubated at 30 °C and 300 rpm and aerated with 7 liters of oxygen/min. Cells were harvested at an optical density of 0.8–1.0 at 600 nm and stored at -70 °C until used. NADP-GDH was purified by a modified version of the method of Doherty (23). All steps were carried out at 5 °C.

**Step 1: Whole Cell Soluble Protein Extract**—Cells were thawed and resuspended in 1 ml of buffer A (100 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 50  $\mu$ g of

N<sup>o</sup>-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK)/ml)/g of cells. Crude extracts were obtained after mechanical disruption of cells with a Bead-Beater (8 cycles of 1 min). After centrifugation at 30,000  $\times$ g for 30 min, protein extracts were resuspended in buffer A and diluted to ~25 mg/ml.

**Step 2: Ammonium Sulfate Fractionation**—Proteins that precipitated between 40 and 65% saturation of ammonium sulfate were resuspended in buffer A. Mixtures were dialyzed twice against 4 liters of buffer B (20 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA).

**Step 3: DEAE Bio-Gel A Chromatography**—Dialyzed fractions were applied to a DEAE Bio-Gel A column (23 by 2.8 cm) equilibrated with buffer C (20 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 50 mg of TLCK/liter). After sample application, the column was washed with 5 column volumes of buffer B. NADP-GDH was subsequently eluted with a linear NaCl gradient of 10 column volumes (0–0.5 M). Fractions with NADP-GDH activity were pooled and dialyzed against 4 liters of buffer B.

**Step 4: Affinity Chromatography**—A Reactive Red-agarose column (13 by 1.2 cm) was equilibrated with buffer A. After application of the sample from the previous step, the column was washed with 10 volumes of buffer A. NADP-GDH was eluted with buffer A containing 0.1 mM NADPH. Fractions with NADP-GDH activity were pooled, dialyzed against buffer B, concentrated by ultrafiltration to ~1 mg/ml with an Amicon YM30 membrane, and stored at -70 °C until used.

#### Enzyme Assay and Protein Determination

Whole cell soluble protein extracts were prepared by glass bead lysis of cell pellets harvested during exponential growth, as described (24). NADP-GDH and NAD-GDH were assayed by the method of Doherty (23). One unit of activity is defined as the oxidation of 1.0  $\mu$ mol of NADPH or NADH/min. Protein was measured by the method of Lowry *et al.* (25), using bovine serum albumin as a standard.

#### Preparation of Anti-NADP-GDH Antibodies

Antibodies were raised in rabbits injected with purified yeast GDH1-encoded NADP-GDH and partially purified by ammonium sulfate precipitation according to the method of González-Halphen *et al.* (26).

#### Electrophoresis and Immunoblotting

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and native PAGE were performed with 10 and 6% slab gels, respectively. Proteins on polyacrylamide gels were visualized with Coomassie Blue. Immunoblot analysis of SDS-electrophoresed crude extract or pure NADP-GDH was carried out as described by Towbin *et al.* (27). Immunoblot signaling was optimized by analyzing a number of combinations of antigen and antibody concentrations in the linear range of detectability. Scanned blots were subjected to densitometric analysis using the program ImageQuant 4.2 (Molecular Dynamics, Inc., Sunnyvale, CA). Data were

TESIS CON  
FALDA DE ORIGEN

43778

## Yeast NADP-Glutamate Dehydrogenase Isoenzymes

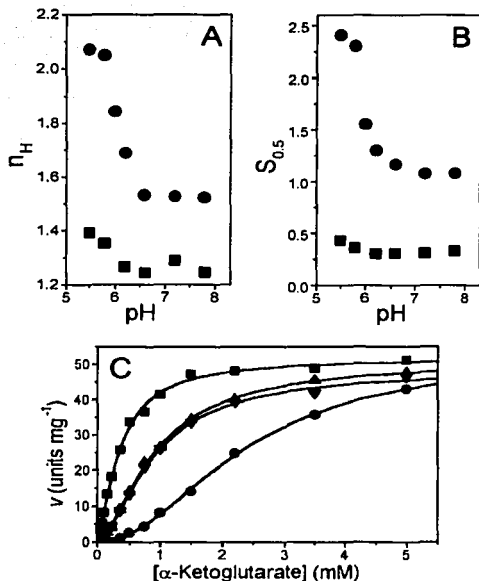


FIG. 3. NADP-GDH isoenzymes show different allosteric properties depending on the concentration of  $\alpha$ -ketoglutarate. Plots show the dependence of  $n_H$  (A) and  $S_{0.5}$  (B) on the pH of the reaction. C, at pH 5.8, the relative rates of the NADP-GDH purified from the wild-type strain depend on the relative abundance of each isoenzyme. Assays were carried out in 25 mM acetic acid, 25 mM MES, 50 mM Tris buffer, at 25°C. Purified samples used in this experiment were the same as those shown in Fig. 1B.  $\blacksquare$ , Gdh1p enzyme;  $\bullet$ , Gdh3p enzyme;  $\blacktriangle$ , wild-type NADP-GDH;  $\blacktriangledown$ , Gdh1p plus Gdh3p (3:1 mixture).

normalized to the immunoblot signals of the corresponding purified protein.

## Molecular Mass Determination

Native molecular mass was determined on a Sephacryl S-300 gel filtration column (2.6 by 90 cm) equilibrated with 50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 1 mM dithiothreitol. The column was calibrated with molecular mass standards (29–700 kDa) from Sigma. Purified NADP-GDH was diluted in the same buffer, loaded into the column, and eluted at a rate of 6 ml/h. Molecular mass was determined from a plot of the log molecular mass against elution volume per void volume.

The apparent molecular masses of denatured subunits were determined by SDS-PAGE with molecular mass standards (29–205 kDa) from Sigma.

## Amino-terminal Sequencing

The isolation of polypeptides for amino-terminal sequencing was carried out as described previously (28). Edman degradation was carried on an Applied Biosystems Sequencer at the Laboratoire de Microséquence des Protéines (Institut Pasteur, Paris, France).

## Enzyme Kinetics and Analysis of Kinetic Data

NADP-GDH activity was assayed for the reductive amination reaction at different concentrations of  $\alpha$ -ketoglutarate, NADPH, or ammonium chloride and at saturating concentrations of the remaining substrates (8 mM  $\alpha$ -ketoglutarate, 200  $\mu\text{M}$  NADPH, and 50 mM ammonium chloride). For the oxidative deamination reaction, different concentrations of glutamate or NADP<sup>+</sup> and saturating concentration of the remaining substrate (100  $\mu\text{M}$  glutamate and 300  $\mu\text{M}$  NADP<sup>+</sup>) were used. The progress of the reaction was always kept below 5% conversion of the initial substrate. Measurements were made at 25°C in 100 mM Tris at pH 7.2 or 8.0 for the reductive amination or oxidative deamination reaction, respectively. For experiments in which pH was varied, 25 mM acetic acid, 25 mM MES, 50 mM Tris was used as buffer. This buffer

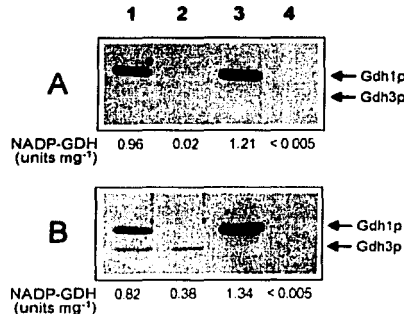


FIG. 4. Levels of Gdh1p and Gdh3p are differentially regulated by carbon source. Cells were grown on MM supplemented with glucose (A) or ethanol (B) and subjected to immunoblot analysis using Gdh1p antiserum. Cells were harvested during logarithmic growth, and protein extracts were assayed for NADP-GDH activity and electrophoresed (SDS-10% PAGE, 20  $\mu\text{g}$  of protein/lane). Lane 1, CLA4 (wild type); lane 2, CLA6 (*gdh1* $\Delta$ ); lane 3, CLA7 (*gdh3* $\Delta$ ); lane 4, CLA10 (*gdh1* $\Delta$  *gdh3* $\Delta$ ).

minimizes the change of ionic strength with pH (29). Kinetic data were analyzed by nonlinear regression using the program Origin 4.1 (MicroCal Software, Inc.).

Extraction and Determination of Intracellular  $\alpha$ -Ketoglutarate

Protein-free cell extracts were prepared as described by Kang *et al.* (30). The intracellular concentration of  $\alpha$ -ketoglutarate relative to protein concentration was determined with beef glutamate dehydrogenase (Sigma) by following NADH oxidation (31).

## Determination of Extracellular Glucose Concentration

Cells were filtered through 0.22- $\mu\text{m}$  Millipore membranes. Extracellular glucose concentration was determined in the filtrate with the Glucose [HK] kit from Sigma.

## RESULTS

**NADP-GDH Purification from Mutant and Wild-type Strains**—*S. cerevisiae* is the first microorganism in which the existence of two NADP-GDH isoenzymes has been reported (6). Although yeast NADP-GDH has been previously purified and characterized (32), the properties described could be ascribed to either or both isoenzymes. Therefore, we purified the Gdh1p and Gdh3p enzymes to electrophoretic homogeneity to study their individual biochemical properties. Gdh1p was 36-fold purified from the CLA14-11 mutant strain harboring plasmid pLAM11, whereas Gdh3p was 49-fold purified from strain CLA14-22 bearing plasmid pLAM22. Additionally, NADP-GDH was 252-fold purified from the wild-type strain CLA4 grown on ethanol, a condition in which both isoenzymes are readily expressed (see below). Apparent molecular masses of the monomers were 51 and 46 kDa for Gdh1p and Gdh3p, respectively (Fig. 1A). The observed molecular mass of the latter was at variance with the expected value deduced from its amino acid sequence, which is 49.6 kDa. This suggested the existence of a post-translational modification of Gdh3p, which remains to be identified. Amino-terminal sequencing was not possible, because both Gdh1p and Gdh3p purified polypeptides were blocked.

The active oligomeric structures of the purified samples obtained from the wild-type and mutant strains were hexameric, as revealed by gel filtration experiments (data not shown). This is in agreement with results obtained for all members of the small glutamate dehydrogenase subfamily, which show an  $\alpha_6$  50-kDa oligomeric structure (33) and whose three-dimensional crystal structure has been reported (34, 35). Native PAGE

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

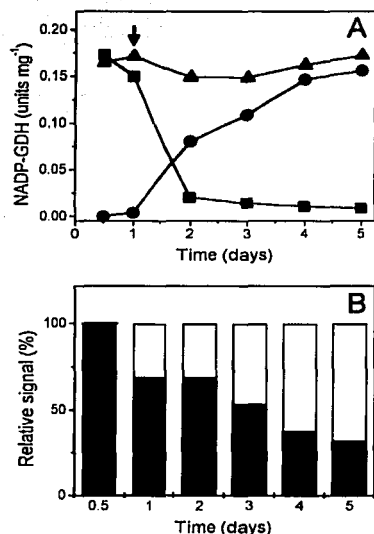


Fig. 5. Relative levels of Gdh1p and Gdh3p change depending on growth phase. A, yeast were cultured by extended growth in YPD-rich medium. Aliquots were withdrawn at different times, and protein extracts were assayed for NADP-GDH activity. Extracellular glucose concentration was determined in parallel; a dark arrow indicates the time at which glucose was exhausted from the medium. ■, CLA7 (*gdh3Δ*); ●, CLA6 (*gdh1Δ*); ▲, CLA4 (wild type). B, the abundance of each isoenzyme relative to the total NADP-GDH of the wild-type strain was calculated from the normalized densitometric analysis of immunoblot signals obtained for electrophoresed protein extracts of strain CLA4. Black bars, Gdh1p; white bars, Gdh3p.

analysis of the protein purified from the wild-type strain showed a smeared pattern (Fig. 1B, lane 3), compared with the sharp bands observed when a mixture of equivalent amounts of purified homomeric proteins was electrophoresed (Fig. 1B, lane 4). Hence, the enzyme purified from the wild-type strain was most probably a natural mixture of several isoforms built up by the oligomerization of the two different monomers encoded by *GDH1* and *GDH3*. In SDS-PAGE electrophoresis, the NADP-GDH purified from the wild-type strain grown on ethanol showed two bands corresponding to Gdh1p and Gdh3p monomers (Fig. 1A). Densitometric analysis of Coomassie-stained gels revealed that 73% of the total NADP-GDH was composed of Gdh1p; the remaining 27% corresponded to Gdh3p.

**Kinetic Analysis of NADP-GDH Isoenzymes**—Enzymological properties were separately determined for the Gdh1p and Gdh3p homomeric NADP-GDHs. Activities were measured in Tris-MES-acetic acid buffer at pH values ranging from 4.5 to 9.5 (data not shown); maximum activity was obtained at pH 6.8 for both enzymes. We examined the dependence of NADP-GDH activity on  $\alpha$ -ketoglutarate, NADPH, or ammonium, using saturating concentrations of the two remaining substrates (Fig. 2). Both isoenzymes showed hyperbolic behavior at increasing NADPH and ammonium concentrations but sigmoidal responses to increasing  $\alpha$ -ketoglutarate concentrations (Fig. 2A).

NADP-GDH isoenzymes showed  $V_{max}$  values that were similar in all experiments (130–150 units  $mg^{-1}$ ). All substrates caused inhibition of enzyme activity above a given threshold concentration (data not shown). NADPH began to inhibit the activity of both enzymes at a concentration of 300  $\mu M$  (10% inhibition); with 100 mM ammonium chloride, we observed a

similar effect. A 5% inhibition of the maximal activity was observed with 10 mM  $\alpha$ -ketoglutarate for the Gdh1p enzyme, whereas a 25 mM substrate concentration was needed to generate the same inhibition of the Gdh3p enzyme.

For the Gdh1p enzyme assayed in both directions of the NADP-GDH reaction, the  $K_m$  values for NADPH, ammonium, NADP<sup>+</sup>, and glutamate were 11.3  $\mu M$ , 5.96 mM, 14.1  $\mu M$ , and 9.79 mM, respectively. Values of 33.1  $\mu M$ , 5.00 mM, 10.5  $\mu M$ , and 6.36 mM, respectively, were obtained for the Gdh3p isoenzyme. Phosphate competitive inhibition on NADPH binding has been previously described for yeast NADP-GDH (36). We confirmed that with respect to NADPH concentration, phosphate competitively inhibited both isoenzymes at various concentrations (0–250 mM sodium phosphate) (data not shown). However, Gdh3p was more sensitive to this effect, with a  $K_i$  value for phosphate of 9.3 mM, compared with 72.5 mM for the Gdh1p enzyme.

Differences were also found between the two isoenzymes in their kinetics for  $\alpha$ -ketoglutarate. At pH 7.2, substrate concentrations at which rates were equal to half the  $V_{max}$  ( $S_{0.5}$ ) were 0.29 and 1.27 mM for the Gdh1p and Gdh3p enzyme, respectively. Hill coefficients ( $n_{H1}$ ) in the same experiments were 1.3 and 1.5 for the Gdh1p and Gdh3p enzyme, respectively. In this regard, hexameric glutamate dehydrogenases from other organisms are known to be allosteric enzymes activated by different molecules (AMP, ADP, GTP, ATP, NADP<sup>+</sup>, succinate, aspartate, and asparagine) (33, 37–39). The effect of these compounds was assayed for the yeast NADP-GDH isoenzymes, but none of them behaved as an allosteric effector (data not shown). However, sigmoidal kinetics could most likely reflect a phenomenon of cooperativity, since  $n_{H1}$  values strictly depended on the pH at which the kinetics for  $\alpha$ -ketoglutarate was assayed (Fig. 3A). The  $n_{H1}$  plot for the Gdh3p isoenzyme against pH showed an inflection point at pH 6.2. Near optimum pH, Gdh3p exhibited a higher  $S_{0.5}$  value compared with its homologue; this difference was higher at low pH (Fig. 3B). Conversely, the Gdh1p isoenzyme showed no considerable changes in sigmoidicity and had higher affinity for  $\alpha$ -ketoglutarate in terms of  $S_{0.5}$ . Thus, the overall data indicate that the NADP-GDH isoenzymes differ in their allosteric properties and rates at which they use  $\alpha$ -ketoglutarate.

We determined  $\alpha$ -ketoglutarate kinetics for the NADP-GDH purified from the wild-type strain and compared them with those of the homomeric Gdh1p and Gdh3p isoenzymes. Since the maximum kinetic differences between the two isoenzymes were observed at pH 5.8, we analyzed the behavior of the wild-type enzyme at this pH. The wild-type enzyme exhibited kinetic parameters ( $S_{0.5}$ , 0.90 mM;  $n_{H1}$ , 1.6) similar to those of a preparation containing 75% Gdh1p and 25% Gdh3p homomeric isoenzymes (Fig. 3C). This indicates that kinetics toward  $\alpha$ -ketoglutarate depends on the relative abundance of the *GDH1*- and *GDH3*-encoded monomers, whether or not these proteins associate in heteromeric structures.

**Relative Levels of Gdh1p and Gdh3p Are Carbon-dependent**—To compare the relative levels of the two NADP-GDHs under different conditions, extracts were prepared from the wild-type or the pertinent null mutant strains grown on glucose or ethanol as carbon sources. The specific activities and immunochemically detected levels of Gdh1p were similar in extracts obtained from the *gdh3Δ* strain grown on glucose or ethanol (Fig. 4, lane 3). For Gdh3p, low levels of NADP-GDH activity were observed, and no signal in immunoblots could be detected when glucose was the carbon source. However, when extracts were prepared from ethanol-grown cells, Gdh3p enzymatic activity increased 20-fold, and an immunoblot signal was clearly observed (Fig. 4, lane 2). Normalized densitometric

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

## Yeast NADP-Glutamate Dehydrogenase Isoenzymes

TABLE II  
NADP-GDH activity of MM-grown strains harboring recombinant plasmids constructed in this study

Strain	Specific activity <sup>a</sup>	
	Glucose	Ethanol
	$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$	
CLA14-0 ( <i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pRS316 (CEN <i>URA3</i> ))	<0.005	<0.005
CLA14-1 ( <i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM1 ( <i>GDH1</i> CEN <i>URA3</i> ))	3.26 ± 0.220	1.36 ± 0.099
CLA14-2 ( <i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM2 ( <i>GDH3</i> CEN <i>URA3</i> ))	0.03 ± 0.007	0.51 ± 0.042
CLA14-3 ( <i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM3 (5' <i>GDH3-GDH1</i> CEN <i>URA3</i> ))	0.12 ± 0.015	0.97 ± 0.076
CLA14-4 ( <i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM4 (5' <i>GDH1-GDH3</i> CEN <i>URA3</i> ))	0.60 ± 0.066	0.62 ± 0.031
CLA14-00 ( <i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pRS426 (2 $\mu$ <i>URA3</i> ))	<0.005	<0.005
CLA14-11 ( <i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM11 ( <i>GDH1</i> 2 $\mu$ <i>URA3</i> ))	9.01 ± 0.85	10.6 ± 1.02
CLA14-22 ( <i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM22 ( <i>GDH3</i> 2 $\mu$ <i>URA3</i> ))	0.17 ± 0.013	8.65 ± 0.77
CLA14-33 ( <i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM33 (5' <i>GDH3-GDH1</i> 2 $\mu$ <i>URA3</i> ))	0.86 ± 0.069	11.4 ± 0.94
CLA14-44 ( <i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM44 (5' <i>GDH1-GDH3</i> 2 $\mu$ <i>URA3</i> ))	2.41 ± 0.311	9.90 ± 0.86

<sup>a</sup> Values are presented as means from three independent experiments ± S.D.TABLE III  
Growth phenotypes and glutamate dehydrogenase activities of strains lacking or overexpressing *GDH1* or *GDH3* in MM

Strain	Relative growth <sup>a</sup>		NADP-GDH Specific activity <sup>b</sup>		NAD-GDH Specific activity <sup>b</sup>	
	Glucose	Ethanol	Glucose	Ethanol	Glucose	Ethanol
	%	%				
CLA11-00 ( <i>GDH1 GDH3</i> /pRS426 (2 $\mu$ <i>URA3</i> ))	100	100	0.884	0.718	0.038	0.055
CLA12-00 ( <i>gdh1Δ GDH3</i> /pRS426 (2 $\mu$ <i>URA3</i> ))	63	55	0.019	0.459	0.032	0.063
CLA13-00 ( <i>GDH1 gdh3Δ</i> /pRS426 (2 $\mu$ <i>URA3</i> ))	105	67	1.34	0.940	0.043	0.156
CLA14-00 ( <i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pRS426 (2 $\mu$ <i>URA3</i> ))	58	45	<0.005	<0.005	0.033	0.041
CLA14-11 ( <i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM11 ( <i>GDH1</i> 2 $\mu$ <i>URA3</i> ))	92	51	10.5	8.98	0.098	0.160
CLA14-12 ( <i>gdh1Δ gdh3Δ</i> /pLAM12 ( <i>GDH3</i> 2 $\mu$ <i>URA3</i> ))	75	82	0.234	7.87	0.035	0.123

<sup>a</sup> Values are shown relative to doubling time of the wild-type strain (2.3 and 9.5 h on glucose and ethanol, respectively) and are presented as means from three independent experiments (variation was always ≤10%).<sup>b</sup> Values are given in  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  of protein and are presented as means from three independent experiments (variation was always ≤10%).

analysis of immunoblots showed that 25% of the wild-type NADP-GDH from ethanol-grown yeasts corresponded to Gdh3p.

In light of the previous results, it was relevant to determine whether NADP-GDHs containing different Gdh1p/Gdh3p ratios could be found in long term yeast cultures. In YPD-rich medium, *S. cerevisiae* grows by fermentation; diauxic shift occurs after glucose is exhausted from the medium and cells adapt to respiratory metabolism using the ethanol produced during glucose fermentation (40). In fermentative growth, with glucose as the only carbon source, NADP-GDH activity was solely due to Gdh1p (Fig. 5, A and B). However, as cells proceeded through postdiauxic growth, different Gdh1p/Gdh3p ratios were observed, and after 5 days of incubation, 70% of the total NADP-GDH activity in the wild-type strain corresponded to Gdh3p (Fig. 5B). Within this context, it is relevant that NADP-GDH proteolysis has been observed after glucose starvation (41); this could account for the specific inactivation of Gdh1p after glucose was exhausted from the medium. Taken together, these results indicate that the relative abundance of Gdh1p or Gdh3p depends on the carbon source.

***GDH3* Expression Is Transcriptionally Regulated by the Nature of the Carbon Source**—To determine whether *GDH3* carbon-dependent regulation was exerted at the transcriptional level, several recombinant plasmids were constructed (see "Experimental Procedures"). NADP-GDH activities were determined for strains derived from the CLA14 mutant strain transformed with these plasmids (Table II). Cells bearing low copy number constructs showed differences in enzymatic activity, which could be mainly attributed to the different levels of expression allowed by the cognate 5' promoter sequences of either *GDH1* or *GDH3*. In glucose-grown cells, Gdh1p-dependent NADP-GDH activity was 27-fold higher when expressed from its own promoter as compared with that fostered by the 5' *GDH3-GDH1* fusion. Likewise, Gdh3p-dependent activity was 20-fold higher when this gene was under the regulation of the *GDH1* pro-

moter sequence (5' *GDH1-GDH3*) than when expressed from its cognate promoter. Similar results were obtained using cells harboring high copy number plasmids. When NADP-GDH activity was monitored in extracts obtained from ethanol-grown cells, high levels were observed for either Gdh1p or Gdh3p, regardless of which promoter fostered expression. These results confirmed that *GDH3* expression was repressed by glucose at the transcriptional level.

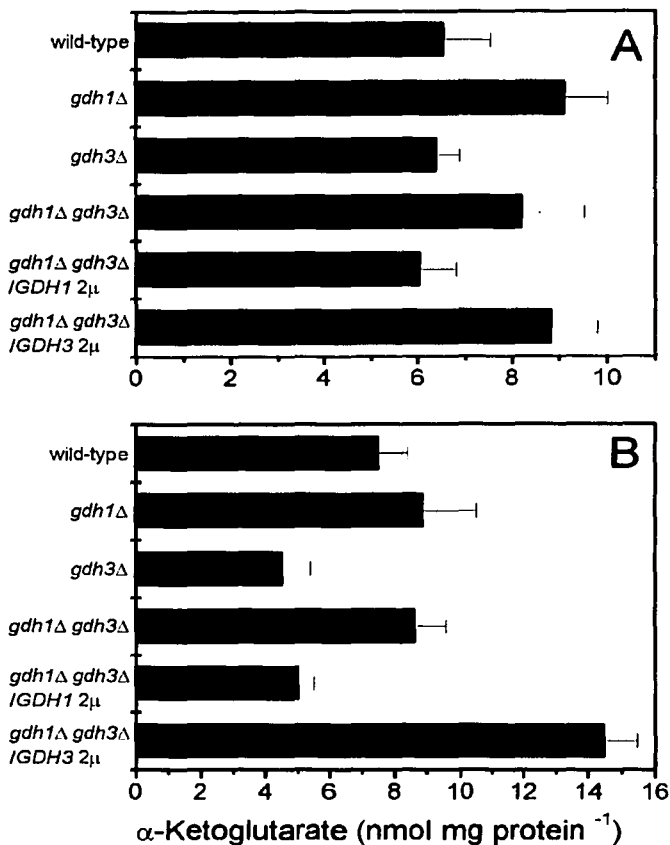
It is worth mentioning that in extracts prepared from glucose-grown cultures, Gdh1p activity was at least 5-fold higher than that of Gdh3p when the genes were expressed from either promoter; this effect was barely observed in ethanol (Table II). Considering that  $V_{\text{max}}$  values are similar for both isoenzymes, this differential level of expression could be attributed to a post-transcriptional level of regulation. In fact, it could be considered that the codon bias difference of these genes (0.75 and 0.19 for *GDH1* and *GDH3*, respectively) may account for different translation rates of their transcripts.

**NADP-GDH Isoenzymes Modulate  $\alpha$ -Ketoglutarate Utilization for Glutamate Biosynthesis**—Gdh1p enzyme is the primary pathway for glutamate biosynthesis in glucose-grown cells (6). Double *gdh1Δ gdh3Δ* mutants lacking NADP-GDH activity are not full glutamate auxotrophs; this strain grows with a 2-fold higher doubling time than that observed in the wild-type strain. This growth is achieved through the action of the *GLT1*-encoded glutamate synthase, which constitutes an ancillary pathway for glutamate biosynthesis (42). *GDH3* expressed from a high copy number plasmid conferred only a partial recovery of the slow growth phenotype of a *gdh1Δ gdh3Δ* strain (Table III), as expected from the observed repression of the *GDH3* gene by glucose. Conversely, *GDH1* expressed from a high copy number plasmid completely restored wild-type growth to a *gdh1Δ gdh3Δ* strain.

It is relevant that in cells grown on ethanol, single disruptions of either *GDH1* or *GDH3* resulted in a slower growth with respect to the wild-type strain. Furthermore, the *gdh1Δ gdh3Δ*

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

FIG. 6. *In vivo*, NADP-GDHs consume  $\alpha$ -ketoglutarate at different relative velocities. Yeast cells were grown on MM supplemented with glucose (A) or ethanol (B) and harvested during logarithmic growth. Protein-free extracts and soluble protein extracts were prepared as described under "Experimental Procedures." Values of intracellular  $\alpha$ -ketoglutarate relative to protein concentration are presented as means from three independent experiments  $\pm$  S.D. Strains used were CLA11-00 (wild-type), CLA12-00 (*gdh1* $\Delta$ ), CLA13-00 (*gdh3* $\Delta$ ), CLA14-00 (*gdh1* $\Delta$  *gdh3* $\Delta$ ), CLA14-11 (*gdh1* $\Delta$  *gdh3* $\Delta$ /pLAM11 (*GDH1* 2 $\mu$ )), and CLA14-22 (*gdh1* $\Delta$  *gdh3* $\Delta$ /pLAM22 (*GDH3* 2 $\mu$ )).



double mutant strain overexpressing *GDH1* from a plasmid grew considerably slower on ethanol than the one bearing the *GDH3* high copy number construct. Thus, it can be concluded that wild-type growth on ethanol depends on both Gdh1p and Gdh3p and that overexpression of *GDH1* could result in a deleterious effect.

Because of the differences in the rates of  $\alpha$ -ketoglutarate *in vitro* utilization by the NADP-GDH isoenzymes, we explored if these differences could be observed *in vivo*. To this end, we measured  $\alpha$ -ketoglutarate intracellular pools in cells lacking or overexpressing *GDH1* or *GDH3*. We also determined the NADP-GDH-specific activities in the various strains, since this catabolic enzyme would be expected to increase  $\alpha$ -ketoglutarate concentration. In yeast cells grown on glucose, the only evident phenotype was due to the lack of *GDH1*; either single (*gdh1* $\Delta$ ) or double (*gdh1* $\Delta$  *gdh3* $\Delta$ ) mutants exhibited a significant accumulation of  $\alpha$ -ketoglutarate. A lack of *GDH3* did not affect either the intracellular concentration of this intermediate or NADP-GDH activity (Fig. 6A, Table III). These results are in consonance with the growth phenotypes observed for the same strains on glucose. When *GDH1* was overexpressed, NADP-GDH activity exhibited a 2-fold increase, suggesting that this activity increased as a result of glutamate accumulation (3, 43). As

expected, *GDH3* overexpression did not result in increased NADP-GDH activity (Table III).

When grown on ethanol, the single *gdh1* $\Delta$  mutant did not show a net increase in  $\alpha$ -ketoglutarate concentration, whereas the *gdh3* $\Delta$  single mutant exhibited a 2-fold lower  $\alpha$ -ketoglutarate pool size as compared with that of the wild-type strain. However, the *gdh1* $\Delta$  *gdh3* $\Delta$  strain had  $\alpha$ -ketoglutarate levels similar to those found in the *gdh1* $\Delta$  mutant; this suggested that the  $\alpha$ -ketoglutarate depletion observed in a *gdh3* $\Delta$  mutant was due to a Gdh1p-dependent consumption of this compound in the absence of the Gdh3p enzyme (Fig. 6B). These results are in agreement with the fact that Gdh1p enzyme has a higher rate of  $\alpha$ -ketoglutarate utilization than the heteromeric enzyme that exists in ethanol-grown cells. Moreover, NADP-GDH specific activity was induced 3-fold in ethanol-grown cells lacking the Gdh3p enzyme (Table III), indicating that under this condition glutamate accumulated, resulting in induced *GDH2* expression (43).

Overexpression of either *GDH1* or *GDH3* in ethanol-grown cells caused an increase in the specific activity of NADP-GDH. However, the effect on  $\alpha$ -ketoglutarate concentration was contrasting. Cells overexpressing *GDH1* showed a reduced  $\alpha$ -ketoglutarate pool size, whereas *GDH3* high copy number expres-

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

sion caused its accumulation. Thus, it can be concluded that *GDH1* overexpression causes a drain of the intracellular  $\alpha$ -ketoglutarate pool, suggesting that *in vivo* Gdh1p uses this compound at a higher rate than Gdh3p.

## DISCUSSION

This study addresses the question of whether *GDH1* and *GDH3* play overlapping or distinct roles and whether these roles are involved in the inherent capacity of *S. cerevisiae* to grow under fermentative or respiratory conditions. The results presented in this paper indicate that the existence of different NADP-GDH isoforms results in glutamate biosynthesis and balanced  $\alpha$ -ketoglutarate utilization. The main observations that support this assertion are the following: (a) NADP-GDHs showed differences in their allosteric properties and rates of  $\alpha$ -ketoglutarate utilization; (b) the relative abundance of both isoenzymes depended on the nature of the carbon source; (c) a *gdh3Δ* mutant grew slowly on ethanol, although it had wild-type NADP-GDH activity levels (this mutant showed reduced  $\alpha$ -ketoglutarate pools and high activity levels of the catabolic NAD-GDH, indicating an abnormal high glutamate production rate); and (d) *GDH1* overexpression from a plasmid did not suppress slow growth or the reduced  $\alpha$ -ketoglutarate pool phenotypes of a *gdh1Δ gdh3Δ* strain; in contrast, overexpression of *GDH3* resulted in faster growth and  $\alpha$ -ketoglutarate accumulation.

It has been recently shown that the regulated expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes is governed by two transcriptional complexes that function alternatively, depending on the integrity of the respiratory function (44). The *HAP* system regulates the expression of genes that lead to the synthesis of  $\alpha$ -ketoglutarate during respiratory metabolism (12), whereas expression of these genes is controlled by the *RTG* system when respiratory function is dampened or lost. This model considers that glutamate plays a central role by repressing *RTG*-dependent expression of genes leading to  $\alpha$ -ketoglutarate (44), thus indicating that NADP-GDH activity should be controlled accordingly. A yeast NADP-GDH activity was previously purified (32) at a time when the existence of two isoenzymes was not yet recognized; thus, the kinetic properties and regulation of each isoenzyme could not possibly be discerned. In this study, purification and independent characterization of Gdh1p and Gdh3p enzymes shows that yeast possesses NADP-GDH isoforms that differ in their biochemical properties.

Even after the two NADP-GDHs were recognized, induction of *GDH3* could not be observed in genome-wide transcription analysis of ethanol-grown yeast, probably because of detectability limitations (45, 46). The results presented here differ from those mentioned above and show unequivocally that *GDH3* expression is ethanol-induced and glucose-repressed and that *GDH1* expression is high on both carbon sources. This brings into accountability the role of the different NADP-GDH isoenzymes in either glucose or ethanol-grown cells. Our results also consider the allosteric regulation of the *GDH3*-encoded enzyme, which suggests particular regulatory properties for this activity *in vivo*. This would mediate a more relaxed distribution of  $\alpha$ -ketoglutarate to either glutamate biosynthesis or energy-yielding metabolism when cells grow on a nonfermentable or limiting carbon source. During fermentative growth, glutamate biosynthesis would be afforded by the Gdh1p isoenzyme that uses  $\alpha$ -ketoglutarate at a faster rate. Accordingly, the existence of multiple isoforms of NADP-GDH activity would provide the pacemaker mechanism that assures optimum glutamate biosynthesis in either fermentative or respiratory conditions without compromising the energy-yielding metabolism. Within this context, it is relevant that the nonfacultative yeast *Kluyveromyces lactis*, closely related to *S. cerevi-*

*siae*, bears a single homomeric NADP-GDH enzyme (47).

It has been recognized that the expression of the NAD-GDH catabolic enzyme is induced in the presence of ethanol (43). However, the physiological significance of this observation has remained obscure, since *gdh2Δ* mutants show no evident phenotype in ethanol-grown cultures. Considering the results presented in this paper, it can be suggested that the coordinated action of *GDH1*-, *GDH3*-, and *GDH2*-encoded enzymes allows growth on ethanol, equilibrating the production and utilization of  $\alpha$ -ketoglutarate. This study further confirms that nitrogen and carbon metabolisms are coordinately modulated for ammonium assimilation (11, 48) and that the genetic and metabolic regulation of genes involved in nitrogen metabolism can be influenced by the nature of the carbon source.

Finally and worth mentioning is the existence of other duplicated yeast genes, such as *COX5A/COX5B*, *HYP2/ANB1*, *CYC1/CYC7*, and *AAC2/AAC3*, whose regulation has diverged and which are differentially expressed under aerobic or anaerobic conditions (49). Thus, the described duplication and further diversification of an NADP-GDH gene may be representative of a general mechanism through which *S. cerevisiae* acquired facultative metabolic properties (50).

**Acknowledgments**—We thank C. Aranda and M. Vázquez-Acevedo for skillful technical assistance and X. Aguirre, who worked on the construction of recombinant plasmids. We are grateful to A. Blancas (Unidad de Escalamiento, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM) for assistance in growing yeast cultures in the fermentor; L. Ongay, G. Codiz, and M. Sosa (Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM) for DNA sequencing and synthesis of oligonucleotides; and J. d'Alayer (Institut Pasteur) for amino-terminal peptide sequencing. We are indebted to M. M. Altamirano, F. Bastarrachea, D. C. Fraenkel, D. González-Halphen, and L. Valenzuela for helpful discussions and critical review of the manuscript. We appreciate the encouraging and insightful comments of A. Gómez-Puyou during this work.

## REFERENCES

- Magasanik, B. (1992) In *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae: Gene Expression* (Jones, E. W., Pringle, J. R., and Broach, J. R., ed) pp. 283–317, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Tempest, D. W., Meers, J. L., Brown, C. M. (1970) *Biochem. J.* 117, 405–407
- Roon, R. J., Even, H. L., and Larimore, F. (1974) *J. Bacteriol.* 118, 89–95
- Holzer, H., and Schneider, S. (1957) *Biochem. Z.* 92B, 361–367
- Benachou-Lahfa, N., Forterre, P., and Labedan, B. (1993) *J. Mol. Evol.* 36, 335–346
- Avendaño, A., DeLuna, A., Olivera, H., Valenzuela, L., and González, A. (1997) *J. Bacteriol.* 179, 5594–5597
- Smith, E. L. (1975) In *The Enzymes*, Vol. XI (Boyer, P. D., ed) pp. 293–367, Academic Press, Inc., New York
- Miller, S. M., and Magasanik, B. (1990) *J. Bacteriol.* 172, 4927–4935
- Drillien, R., and Lacroute, F. (1972) *J. Bacteriol.* 109, 203–208
- Grenson, M., Dubois, E., Piotrowska, M., Drillien, R., and Aigle, M. (1974) *Mol. Gen. Genet.* 128, 73–85
- Dang, V. D., Bohn, C., Bolotin-Fukuhara, M., and Daignan-Fornier, B. (1996) *J. Bacteriol.* 178, 1842–1849
- Forsberg, S. L., and Guarente, L. (1989) *Annu. Rev. Cell Biol.* 5, 153–180
- Cox, K. H., Pinchack, A. B., and Cooper, T. C. (1999) *Yeast* 15, 703–713
- Janas, B. K., Pomposiello, P. J., Perez-Matos, A., Najarian, D. J., Goss, T. J., and Bender, R. A. (2001) *J. Bacteriol.* 183, 2709–2714
- Ninfa, A., Jiang, P., Atkinson, M. R., and Peliska, J. A. (2000) *Curr. Top. Cell Res.* 36, 31–75
- Boy-Marcotte, E., Perrot, M., Bussereau, F., Boucherie, H., and Jacquet, M. (1998) *J. Bacteriol.* 180, 1044–1052
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994) *Yeast* 10, 1793–1808
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) *J. Bacteriol.* 153, 163–168
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. pp. 1.1–7.87, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Sikorski, R. S., and Hieter, P. (1989) *Genetics* 122, 19–27
- Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H., Hieter, P. (1992) *Gene (Amst.)* 110, 119–122
- Bussey, H., Kaback, D. B., Zhong, W., Vo, D. T., Clark, M. W., Fortin, N., Hall, T., Ouellette, B. F., Keng, T., Barton, A. B., Su, Y., Davies, C. J., and Stormo, R. K. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3609–3613
- Doherty, D. (1970) *Methods Enzymol.* 17, 850–856
- Cogoni, C., Valenzuela, L., González-Halphen, D., Olivera, H., Macino, G., Ballarín, P., and González, A. (1995) *J. Bacteriol.* 177, 792–798

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

25. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275
26. González-Halphen, D., Lindorfer, M. A., Capaldi, R. A. (1988) *Biochemistry* **27**, 7021-7031
27. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) *Bio/Technology* **24**, 145-149
28. Gutierrez-Cirlos, E. B., Antaramian, A., Vazquez-Acevedo, M., Coria, R., and Gonzalez-Halphen, D. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 9147-9154
29. Ellis, K. J., Morrison, J. F. (1982) *Methods Enzymol.* **87**, 405-426
30. Kang, L., Keeler, M. L., Dunlop, P. C., and Roon, R. J. (1982) *J. Bacteriol.* **151**, 29-35
31. Dubois, E., Grenson, M., and Wiame, J. M. (1974) *Eur. J. Biochem.* **48**, 603-616
32. Camardello, L., Di Prico, G., Garofano, F., and Guerrini, A. M. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* **429**, 324-330
33. Miñambres, B., Olivera, E. R., Jensen, R. A., and Luengo, J. M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 39529-39542
34. Baker, P. J., Britton, K. L., Engel, P. C., Farrants, G. W., Lilley, K. S., Rice, D. W., and Stillman, T. J. (1992) *Proteins* **12**, 75-86
35. Yip, K. S., Stillman, T. J., Britton, K. L., Artymiuk, P. J., Baker, P. J., Sedelnikova, S. E., Engel, P. C., Pasquo, A., Chiaraluce, R., Consalvi, V., Scandurra, R., and Rice, D. W. (1995) *Structure* **3**, 1147-1158
36. Venard, R., Jallon, J. M., Fourcade, A., Iwatsubo, M. (1975) *Eur. J. Biochem.* **57**, 371-378
37. Veronese, F. M., Boccu, E., and Conventi, L. (1975) *Biochim. Biophys. Acta* **377**, 217-228
38. Lascu, I., Barzu, T., Ty, N. G., Ngoc, L. D., Barzu, O., and Mantsch, H. H. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* **482**, 251-260
39. Bonete, M. J., Pérez-Pomares, F., Ferrer, J., and Camacho, M. L. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1289**, 14-24
40. Fuge, E. K., Braun E. L., Werner-Washburne, M. (1994) *J. Bacteriol.* **176**, 5802-5813
41. Mazón, M. J., and Hemmings, B. A. (1979) *J. Bacteriol.* **139**, 686-689
42. Valenzuela, L., Ballario, P., Aranda, C., Filetici, P., and González, A. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 3533-3540
43. Coschigano, P. W., Miller, S. M., and Magasanik, B. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4455-4465
44. Liu, Z., and Butow, R. A. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6720-6728
45. Shanji, A., Kuruvilla, F. G., and Schreiber, S. L. (2000) *Curr. Biol.* **10**, 1574-1581
46. Kuruvilla, F. G., Shanji, A. F., and Schreiber, S. L. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 7283-7288
47. Romero, M., Guzmán-León, S., Aranda, C., González-Halphen, D., Valenzuela, L., and González, A. (2000) *Microbiology* **146**, 239-245
48. ter Schure, E. G., van Riel, N. A., and Verrips, T. (2000) *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 67-83
49. Kwast, K. E., Burke, P. V., and Poyton, R. O. (1998) *J. Exp. Biol.* **201**, 1177-1195
50. Piškur, J. (2001) *Trends Genet.* **17**, 302-303

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA



## OTROS TRABAJOS

En esta sección se anexa una serie de artículos publicados o en preparación, relacionados de alguna u otra manera al estudio de las NADP-GDHs de *S. cerevisiae*. Pese a que la información que contienen escapa a la línea central de los objetivos de este trabajo de Tesis, estos documentos resultan útiles para ahondar en algunos de los puntos discutidos a lo largo del presente estudio.

Los resultados comunicados en el ARTÍCULO 2 son el antecedente principal de este trabajo de Tesis. En el artículo, se reporta el análisis de las mutantes interrumpidas en los genes *GDH1*, *GDH3* y *GLT1*, a partir del cual se encontró que *GDH3* tiene un papel fisiológico; la isoenzima NADP-GDH que codifica es capaz de llevar a cabo la asimilación de amonio y biosíntesis de glutamato en mutantes *gdh1Δ glt1Δ*. Por tanto, *S. cerevisiae* es el primer organismo conocido con tres genes que participan en esta función metabólica.

El ARTÍCULO 3 condensa, en cierta forma, buena parte de los resultados y conceptos discutidos en este trabajo de Tesis. En la primera parte del artículo, se presentan diferentes hipótesis que tratan de explicar el significado fisiológico de la redundancia génica en *S. cerevisiae*. En seguida, se presentan los resultados del estudio de las NADP-GDHs, que ha permitido demostrar que la presencia de *GDH1* y *GDH3* facilita la regulación del metabolismo facultativo. Se discute la posibilidad de que la duplicación y posterior diversificación de una GDH anabólica sea un fenómeno representativo del mecanismo general a través del cual esta levadura desarrolló habilidades metabólicas facultativas.

En el ARTÍCULO 4 se reporta el análisis de la regulación transcripcional de *GDH1*. Los datos comunicados en este artículo permiten concluir que la acción de las diferentes combinaciones de factores reguladores sobre el gen que codifica para esta isoforma de NADP-GDH resulta en un mecanismo que coordina de manera estricta la utilización de carbono y de nitrógeno en *S. cerevisiae*. El control de la expresión de *GDH1* parece ser más estricto en condiciones respiratorias, tomando en cuenta que en esta condición se registra la acción de un mayor número de factores reguladores. Por tanto, el control de la presencia relativa de Gdh1p y Gdh3p depende de la regulación transcripcional de *GDH1* durante el crecimiento respiratorio.

Por último, el ARTÍCULO 5 comprende una breve revisión del estado actual del conocimiento sobre el fenómeno de la desamidación espontánea de proteínas, el cual

puede tener repercusiones importantes en el recambio y el envejecimiento de proteínas *in vivo*. En el trabajo, se inspeccionan los residuos de Asn presentes en las NADP-GDHs de *S. cerevisiae*, con el fin de evaluar su presunta susceptibilidad a la desamidación espontánea. Para ello, se consideran el ambiente de la secuencia, localización topológica y exposición al solvente de dichos residuos de Asn. Este análisis *in silico* es el punto de partida para el estudio de la desamidación espontánea *in vitro* e *in vivo* de las NADP-GDHs de la levadura.

## *GDH3* Encodes a Glutamate Dehydrogenase Isozyme, a Previously Unrecognized Route for Glutamate Biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*

AMARANTA AVENDAÑO, ALEXANDER DELUNA, HIRAM OLIVERA,  
 LOURDES VALENZUELA, AND ALICIA GONZALEZ\*

Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional  
 Autónoma de México, 04510 México City, México

Received 9 June 1997/Accepted 27 June 1997

It has been considered that the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, like many other microorganisms, synthesizes glutamate through the action of NADP<sup>+</sup>-glutamate dehydrogenase (NADP<sup>+</sup>-GDH), encoded by *GDH1*, or through the combined action of glutamine synthetase and glutamate synthase (GOGAT), encoded by *GLN1* and *GLT1*, respectively. A double mutant of *S. cerevisiae* lacking NADP<sup>+</sup>-GDH and GOGAT activities was constructed. This strain was able to grow on ammonium as the sole nitrogen source and thus to synthesize glutamate through an alternative pathway. A computer search for similarities between the *GDH1* nucleotide sequence and the complete yeast genome was carried out. In addition to identifying its cognate sequence at chromosome XIV, the search found that *GDH1* showed high identity with a previously recognized open reading frame (*GDH3*) of chromosome I. Triple mutants impaired in *GDH1*, *GLT1*, and *GDH3* were obtained. These were strict glutamate auxotrophs. Our results indicate that *GDH3* plays a significant physiological role, providing glutamate when *GDH1* and *GLT1* are impaired. This is the first example of a microorganism possessing three pathways for glutamate biosynthesis.

Two pathways for ammonium assimilation and glutamate biosynthesis have been found in a variety of organisms. The first one, described by Holzer and Schneider in 1957 (12), is mediated by NADP<sup>+</sup>-glutamate dehydrogenase (NADP<sup>+</sup>-GDH; EC 1.4.1.4), which catalyzes the reductive amination of 2-oxoglutarate to form glutamate. In an alternative pathway demonstrated by Tempest et al. (25), glutamate is aminated to form glutamine by glutamine synthetase (GS; EC 6.3.1.2), the amide group of which is then transferred reductively to 2-oxoglutarate by glutamate synthase (GOGAT; EC 1.4.1.13), resulting in the net conversion of ammonium and 2-oxoglutarate to glutamate. The GS-GOGAT pathway has been found in several microorganisms (2, 13, 16, 23) and in higher plants (18).

In *Saccharomyces cerevisiae*, both pathways for glutamate biosynthesis are present (7, 19). Mutants altered in NADP<sup>+</sup>-GDH have been isolated (6); these show a higher doubling time than that of the wild type when both strains are grown on minimal medium supplemented with ammonia as the sole nitrogen source. Mutants impaired in GOGAT activity were selected from NADP<sup>+</sup>-GDH-less mutants as glutamate auxotrophs (7, 19). Genetic analysis of one of these mutants showed that the lack of GOGAT activity was due to the presence of two mutations (*gus1* and *gus2*), which suggested the existence of two GOGAT enzymes in *S. cerevisiae* (7). Cloning of the GOGAT structural gene (*GLT1*) and construction of null GOGAT mutants definitively established that this yeast possesses a single NADH-GOGAT enzyme (4) and that GOGAT-less mutants (7) which cannot be complemented with *GLT1* (unpublished results) are probably impaired in *GLT1* regula-

tion. In this paper we report the characterization of strains impaired in either *GDH1*, *GLT1*, or both. Our results show that there is a third pathway for glutamate biosynthesis, mediated by an NADP<sup>+</sup>-GDH encoded by *GDH3*.

Mutants impaired in *GDH1* or *GLT1* were derived from strains CLA1 (*ura3 leu2*), CLA2 (*ura3 LEU2*), and CLA3 (*URA3 leu2*) (Table 1). CLA4, a prototrophic derivative of CLA1, was used as a wild-type control (Table 1). Null *glt1Δ* mutants were obtained as previously described (4). Plasmids pLV1 and pLV2 harbored a 4.5-kb *GLT1* fragment and the *URA3* (pLV1) or *LEU2* (pLV2) yeast genes. Both plasmids were sequenced with the Sequenase V.2 kit (U.S. Biochemicals [USB]). Strains CLA2 and DAN1 were transformed according to the method described by Hinne et al. (10) with *Bgl*II-linearized preparations of pLV1 and pLV2 yielding, respectively, strains CLA5 (*GDH1 GDH3 glt1Δ::URA3*) and DAN2 (*gdh1 GDH3 glt1Δ::LEU2*). Southern analysis was carried out as described by Sambrook et al. (22). The results indicated that plasmid insertion had occurred in the wild-type chromosomal *GLT1* gene. Isolation and characterization of an ethyl methanesulfonate (EMS)-derived *GDH1* mutant has been described previously (7). In order to obtain a null *GDH1* mutant, the following pair of deoxyoligonucleotides was prepared: A1, 5'-CAGAATTTCAACAAGCTT3', from bp 961 to bp 978 and A2, 5'-ACCGATATCACCAGC3', from bp 1410 to bp 1392 of the *GDH1* gene (20, 21). PCR amplification of yeast genomic DNA was carried out in a thermocycler (PTC-100; MJ Research, Inc.). The 450-bp amplification product was gel purified and ligated into the *Bam*HI-*Sall* site of either YIp5 (24), harboring the *URA3* yeast gene, or YIp351 (9), harboring the *LEU3* yeast gene, generating plasmids pLV3 and pLV4. These subclones were sequenced by primer extension with the Sequenase V.2 kit (USB), confirming that we had specifically amplified a *GDH1* fragment. Plasmids pLV3 and pLV4 were linearized after *Bgl*II digestion and used to direct homologous recombination into the yeast genome, generating strain CLA6

\* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, 04510 México City, México. Phone: 525 6225631. Fax: 525 6225630. E-mail: amanjarr@ifcsun1.ifisiol.unam.mx.

TABLE 1. *S. cerevisiae* strains

Strain	Genotype	Source
W303-1A	<i>MAT<math>\alpha</math> ade1 leu2 ura3 trp1 his3 can1-100</i>	Yeast Genetic Stock Center
p49	<i>MAT<math>\alpha</math> lys2 gal2</i>	Yeast Genetic Stock Center
CN31	<i>MAT<math>\alpha</math> his1 gdh1</i>	Yeast Genetic Stock Center
CLA1	<i>MAT<math>\alpha</math> GDH1 GDH3 GLT1 ura3 leu2 (W303-1A <math>\times</math> p49)</i>	This study
CLA2	<i>MAT<math>\alpha</math> GDH1 GDH3 GLT1 ura3 LEU2::Y1p351</i>	This study
CLA3	<i>MAT<math>\alpha</math> GDH1 GDH3 GLT1 URA3::Y1p5 leu2</i>	This study
CLA4	<i>MAT<math>\alpha</math> GDH1 GDH3 GLT1 URA3::Y1p5 LEU2::Y1p351</i>	This study
CLA5	<i>MAT<math>\alpha</math> GDH1 GDH3 gdh1<math>\Delta</math>::URA3 LEU2::Y1p351</i>	This study
CLA6	<i>MAT<math>\alpha</math> gdh1<math>\Delta</math>::URA3 GDH3 GLT1 LEU2::Y1p351</i>	This study
CLA7	<i>MAT<math>\alpha</math> GDH1 gdh3<math>\Delta</math>::LEU2 GLT1 URA3::Y1p5</i>	This study
CLA8	<i>MAT<math>\alpha</math> gdh1<math>\Delta</math>::LEU2 GDH3 gdh1<math>\Delta</math>::URA3</i>	This study
CLA9	<i>MAT<math>\alpha</math> GDH1 gdh3<math>\Delta</math>::LEU2 gdh1<math>\Delta</math>::URA3</i>	This study
CLA10	<i>MAT<math>\alpha</math> gdh1<math>\Delta</math>::URA3 gdh3<math>\Delta</math>::LEU2 GLT1</i>	This study
DAN1	<i>MAT<math>\alpha</math> gdh1 GDH3 GLT1 ura3 leu2 (W303-1A <math>\times</math> CN31)</i>	This study
DAN2	<i>MAT<math>\alpha</math> gdh1 GDH3 gdh1<math>\Delta</math>::LEU2 ura3</i>	This study
DAN3	<i>MAT<math>\alpha</math> gdh1 gdh3<math>\Delta</math>::URA3 gdh1<math>\Delta</math>::LEU2</i>	This study

(*gdh1 $\Delta$  GDH3 GLT1*) from CLA2. Southern analysis was carried out with the 450-bp *GDH1* insert as a probe. The pattern of transformants clearly indicated that the insertion of the construct had occurred in the wild-type genomic sequence of *GDH1* (Fig. 1).

The *gdh1 $\Delta$*  mutant strain CLA5 (*GDH1 GDH3 gdh1 $\Delta$* ) showed no growth phenotype, so it was indistinguishable from a wild-type strain grown on ammonium (Fig. 2A). In all cases, cells were grown on minimal medium containing the same salts, trace elements, and vitamins used in yeast nitrogen base medium (Difco Laboratories, Detroit, Mich.). Glucose (2%) was used as the carbon source. As had been found previously (6, 7),

*GDH1*-less mutants showed a twofold higher duplication time when grown on ammonium (Fig. 2A); on glutamate they grew as well as the wild-type strain (data not shown). A double null mutant devoid of *GDH1* and *GLT1* (CLA8; *gdh1 $\Delta$  GDH3 gdh1 $\Delta$* ) was prepared by successively transforming strain CLA1 (*GDH1 GLT1 GDH3 ura3 leu2*) with plasmids pLV1 and pLV4. Unexpectedly, the CLA8 double mutant was able to grow on ammonium with a duplication time of 7 h (Fig. 2B), thus indicating the existence of a third pathway for glutamate biosynthesis. Similar results were obtained with a double mutant strain (DAN2) carrying the *GDH1*-less EMS-derived mutation and the *gdh1 $\Delta$*  null mutation (Fig. 2B).

Chromosome I sequencing revealed the presence of a

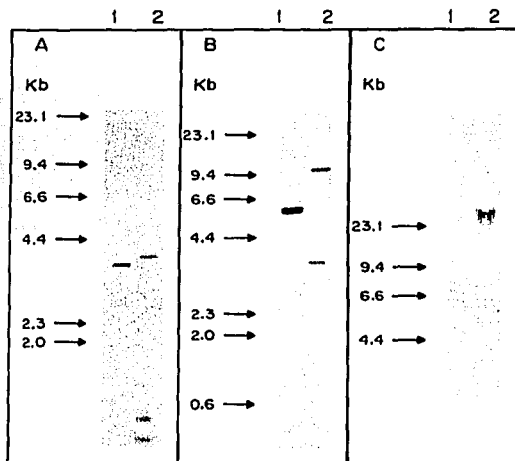


FIG. 1. Southern analysis of DNA. (A) Lanes: 1, wild-type strain (CLA4); 2, *gdh1 $\Delta$*  null mutant strain (CLA6) digested with *EcoRI-SalI*. (B) Lanes: 1, wild-type strain (CLA4); 2, *gdh3 $\Delta$*  null mutant strain (CLA7) digested with *HindIII*. (C) Lanes: 1, wild-type strain (CLA4); 2, *gdh1 $\Delta$*  null mutant (CLA5) digested with *AflII*. Samples in panel A were probed with a 450-bp PCR fragment internal to the *GDH1* gene, samples in panel B were probed with a 760-bp PCR fragment internal to the *GDH3* gene, and samples in panel C were probed with a 4.5-kb fragment internal to the *GLT1* gene.

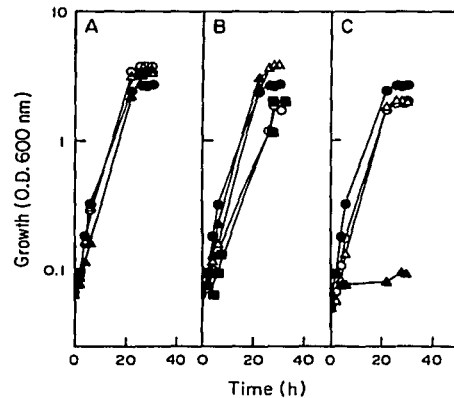


FIG. 2. (A) Growth of strains CLA4 (*GDH1 GDH3 GLT1*) (●), CLA5 (*GDH1 GDH3 gdh1 $\Delta$* ) (○), CLA6 (*gdh1 $\Delta$  GDH3 GLT1*) (▲), and CLA7 (*GDH1 gdh3 $\Delta$  GLT1*) (△). Cells were incubated on minimal medium with 40 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . (B) Growth of strains CLA4 (*GDH1 GDH3 GLT1*) (●), CLA8 (*gdh1 $\Delta$  GDH3 gdh1 $\Delta$* ) (○), CLA9 (*GDH1 gdh3 $\Delta$  gdh1 $\Delta$* ) (▲), CLA10 (*gdh1 $\Delta$  gdh3 $\Delta$  GLT1*) (△), and DAN2 (*gdh1 GDH3 gdh1 $\Delta$* ) (■). Cells were incubated on minimal medium with 40 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Cultures of strain DAN2 were supplemented with 0.2 mM uracil. (C) Growth of strains CLA4 (*GDH1 GDH3 GLT1*) (●) and DAN3 (*gdh1 gdh3 $\Delta$  gdh1 $\Delta$* ) (▲) on minimal medium with 40 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  and strains CLA4 (○) and DAN3 (△) on minimal medium with 5 mM glutamate as the sole nitrogen source. O.D., optical density.

1.37-kb open reading frame showing 75.9% nucleotide sequence identity to *GDH1*; it was termed *GDH3* (3). In order to determine whether *GDH3* was responsible for the growth observed when the double mutant strains *CLA8* and *DAN2* were grown on ammonium, two pairs of deoxyoligonucleotides based on the nucleotide sequence of the *GDH3* open reading frame (3) were prepared: G1, 5'TTCTGTGGAGGATTCCA AAA3', and G2, 5'CGGAAGCGATATCGTGA3', from positions 29029 to 29048 and 29791 to 29775 of chromosome I, respectively. PCR amplification of yeast genomic DNA was carried out in a PTC-100 thermocycler (MJ Research, Inc.). A 760-bp *GDH3* PCR product was gel purified and cloned into the *Bam*HI-*Sall* site of either *Y1p5* (24), harboring the *URA3* yeast gene, or *Y1p351* (9), harboring the *LEU2* yeast gene, generating plasmids pLV5 and pLV6. Both subclones were sequenced by primer extension with the Sequenase V.2 kit (USB), confirming that we had specifically amplified a *GDH3* fragment. Plasmids pLV5 and pLV6 were linearized after *Bgl*III digestion and used to direct homologous recombination into the yeast genome. This allowed the construction of *gdh3Δ* null mutant strains *CLA7* (*GDH1 gdh3Δ GLT1*), *CLA9* (*GDH1 gdh3Δ glt1Δ*), and *CLA10* (*gdh1Δ gdh3Δ GLT1*). The triple mutant strain *DAN3* (*gdh1Δ gdh3Δ glt1Δ*) was constructed from strain *DAN2* by *GDH3* disruption due to pLV6 insertion; *DAN2* already carried the *gdh1* EMS point mutation and the *glt1Δ* null allele (Table 1). Southern analysis was carried out with the 760-bp *GDH3* insert as a probe. The pattern of transformants clearly indicated that the insertion had occurred in the wild-type genomic sequence of *GDH3* (Fig. 1).

As can be seen in Fig. 2A and B, both the single *gdh3Δ* mutant and the double *glt1Δ gdh3Δ* mutant showed no growth phenotype compared to the wild-type strain. The double null mutant strain *CLA10* (*gdh1Δ gdh3Δ*) had a 4.5-h duplication time, the same phenotype displayed by the single *gdh1* (EMS) (7) and *gdh1Δ* mutants (Fig. 2A and B). However, the triple *gdh1 gdh3Δ glt1Δ* (*DAN3*) (Fig. 2C) mutant behaved as a full glutamate auxotroph, indicating that the growth observed when the double *gdh1Δ glt1Δ* (*CLA 8*) and *gdh1 glt1Δ* (*DAN2*) mutants were grown on ammonium was due to the presence of *GDH3*.

NADP<sup>+</sup>-GDH and GOGAT activities were determined as described previously (5, 7) in extracts obtained from strains harboring various combinations of the *gdh1*, *gdh1Δ*, *gdh3Δ*, and *glt1Δ* mutations. Cells were allowed to grow to an optical density at 600 nm of 0.8 to 1.0 and collected by centrifugation. Soluble extracts were prepared by suspending whole cells in their corresponding extraction buffers (5, 7) and grinding them with glass beads in a Vortex mixer. It was found that both the EMS-derived *gdh1* strain and the *gdh1Δ* mutant showed residual NADP<sup>+</sup>-GDH activity, which increased 12- to 15-fold in the absence of GOGAT (Table 2). The double mutant carrying mutations on both *GDH1* and *GDH3* completely lacked NADP<sup>+</sup>-GDH activity (Table 2). Moreover, the NADP<sup>+</sup>-GDH activity detected in the wild-type strain was consistently higher than that found in a *GDH1 gdh3Δ* mutant. Thus, we have concluded that the residual NADP<sup>+</sup>-GDH activity observed in a *GDH1*-less mutant corresponds to a NADP<sup>+</sup>-GDH isoenzyme encoded by *GDH3* (NADP<sup>+</sup>-GDH3). The fact that the NADP<sup>+</sup>-GDH activity was higher in a double mutant impaired in both *GDH1* and *GLT1* than that found in a *gdh1 GLT1* mutant (Table 2) suggests that *GDH3* expression may be down regulated by glutamate. Two observations completely negate the possibility that the NADP<sup>+</sup>-GDH activity found in a *GDH1* mutant could be attributed to a leaky phenotype: first, null and EMS-derived *GDH1* mutations still show NADP<sup>+</sup>-

TABLE 2. NADP<sup>+</sup>-GDH and GOGAT specific activities<sup>a</sup>

Strain (relevant genotype)	Sp act	
	NADP <sup>+</sup> -GDH <sup>b</sup>	GOGAT <sup>c</sup>
<i>CLA4</i> ( <i>GDH1 GDH3 GLT1</i> )	300 (43)	26 (9)
<i>CLA5</i> ( <i>GDH1 GDH3 glt1Δ</i> )	420 (83)	ND <sup>d</sup>
<i>CLA6</i> ( <i>gdh1Δ GDH3 GLT1</i> )	1.6 (0.38)	52 (18)
<i>CLA7</i> ( <i>GDH1 gdh3Δ GLT1</i> )	190 (28)	25 (1.6)
<i>CLA8</i> ( <i>gdh1Δ gdh3Δ glt1Δ</i> )	24 (6)	ND
<i>CLA9</i> ( <i>GDH1 gdh3Δ glt1Δ</i> )	220 (30)	ND
<i>CLA10</i> ( <i>gdh1Δ gdh3Δ GLT1</i> )	ND	50 (16)
<i>CN31</i> ( <i>gdh1 GDH3 GLT1</i> )	2.0 (0.40)	47 (17)
<i>DAN2</i> ( <i>gdh1 GDH3 glt1Δ</i> )	25 (8)	ND

<sup>a</sup> For measurement of NADP<sup>+</sup>-GDH and GOGAT, cells were grown to an optical density at 600 nm of 0.8 with 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

<sup>b</sup> Expressed as nanomoles of NADPH oxidized per minute per milligram of protein (15). The reported values are the means of five experiments. Numbers in parentheses are standard deviations.

<sup>c</sup> Expressed as nanomoles of NADH oxidized per minute per milligram of protein. The reported values are the means of five experiments. Numbers in parentheses are standard deviations.

<sup>d</sup> ND, not detected.

GDH residual activity; second, disruption of *GDH3* in a *gdh1* background completely abolishes NADP<sup>+</sup>-GDH activity.

The fact that only triple mutants impaired in *GDH1*, *GDH3*, and *GLT1* are glutamate auxotrophs shows that *S. cerevisiae* has three pathways for glutamate biosynthesis and that all of them must be abolished in order to attain full glutamate auxotrophy.

The presence of two pathways for glutamate biosynthesis in several microorganisms has stimulated discussion on the need for two routes for the biosynthesis of the same end product. The role of these two pathways has been clearly elucidated in *Klebsiella aerogenes* and *Neurospora crassa*. In *K. aerogenes*, the GS-GOGAT pathway functions to assimilate ammonium and synthesize glutamate when the ammonium concentration is low, while GDH plays this role when the cells are cultivated under ammonium excess (17, 25). In *N. crassa*, it has been shown that the main function of GOGAT is the recycling of some organic nitrogen from glutamine to glutamate and that both GDH and GOGAT are involved in glutamate synthesis either under excess or limiting amounts of ammonium (14). For *Escherichia coli*, it has been recently proposed that glutamate biosynthesis may proceed through NADP<sup>+</sup>-GDH when the cell is energy limited, while the GS-GOGAT pathway functions when the cell is not under energy limitation (8). The roles of GDH and the GS-GOGAT pathways have been studied in some yeasts. For *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, and *Kluyveromyces lactis*, evidence indicates that the GS-GOGAT pathway is the major pathway for ammonium assimilation (1, 11, 26). Regarding the role that *GDH1*, *GDH3*, and *GLT1* play in glutamate biosynthesis in *S. cerevisiae*, our results indicate that, in the presence of *GDH1*, the lack of either *GDH3* or *GLT1* does not result in partial glutamate auxotrophy, suggesting that *GDH1* constitutes the major pathway for glutamate biosynthesis. Simultaneous impairment of *GDH1* and *GLT1* does not result in full glutamate auxotrophy, and double mutants are able to grow on ammonium. Strains lacking *GDH1* and *GDH3* display the same phenotype as that found for single *GDH1* mutants, that is, they are both glutamate prototrophs. These results indicate that glutamate biosynthesis is mainly achieved through NADP<sup>+</sup>-GDH1 and GOGAT.

The isolation of strains partially deleted in *GDH3* has been reported by Wilkinson et al. (27). Those authors concluded

that *GDH3* is not involved in glutamate biosynthesis; this finding was probably due to the fact that they used *GDH1 GLT1* strains to analyze the role of *GDH3*. By contrast, our results show that *GDH3* does play a physiologically significant role in glutamate biosynthesis, allowing considerable growth of the *gdh1 glt1* double mutant in ammonium. However, the individual contributions of NADP<sup>+</sup>-GDH1, NADP<sup>+</sup>-GDH3, and GOGAT in glutamate biosynthesis under different physiological conditions remain to be addressed. Finally, the use of the same cofactor and substrates by NADP<sup>+</sup>-GDH1 and NADP<sup>+</sup>-GDH3 and the high similarity index in their gene sequences argue in favor of divergent evolution of one from the other and perhaps of differences in expression as needed according to physiological cell conditions. We are currently purifying *GDH3* and characterizing its promoter in order to address this matter.

To our knowledge, *S. cerevisiae* is, so far, the only organism having three pathways for glutamate biosynthesis. Since a lack of either GDH or GOGAT does not result in glutamate auxotrophy in most microorganisms, selection of mutants affected in these two pathways has been done by using phenotypic traits supposedly associated with the lack of either GDH or GOGAT. This kind of selection may be biased and in some cases could have resulted, as in *S. cerevisiae*, in the isolation of regulatory mutants affecting more than one pathway for glutamate biosynthesis. Further analysis of the glutamate auxotrophs that have been obtained in other microorganisms may help uncover the existence of additional pathways for glutamate biosynthesis.

We are grateful to Cristina Aranda for skillful technical assistance, to Simon Guzmán and Lina Riego for helpful discussions, and to Guadalupe Espín, Gloria Soberón, and Fernando Bastarrachea for critical review of the manuscript.

This work was supported in part by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México (IN204695), and CONACYT (400360-5-2549PN).

## REFERENCES

- Barel, I., and D. W. Macdonald. 1993. Enzyme defects in glutamate-requiring strains of *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS Microbiol. Lett.* 113:267-272.
- Bravo, A., and J. Mora. 1988. Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway. *J. Bacteriol.* 170:980-984.
- Bussey, H., D. Kaback, W. Zhong, D. T. Vo, M. W. Clark, N. Fortin, J. Hall, B. F. F. Ouellette, T. Keng, A. B. Barton, Y. Su, C. J. Davies, and R. K. Storms. 1995. The nucleotide sequence of chromosome I from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3809-3813.
- Cogoni, C., L. Valenzuela, D. González-Halphen, H. Olivera, G. Macino, P. Ballarín, and A. González. 1995. *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *J. Bacteriol.* 177:792-798.
- Doherty, D. 1970. L-Glutamate dehydrogenases (yeast). *Methods Enzymol.* 17:850-856.
- Drillien, R., and F. Lacroute. 1972. Uridosuccinic acid uptake in yeast and some aspects of its regulation. *J. Bacteriol.* 109:203-208.
- Folch, J. L., A. Antaramián, L. Rodríguez, A. Bravo, A. Brunner, and A. González. 1989. Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant with impaired glutamate synthase activity. *J. Bacteriol.* 171:6776-6781.
- Helling, R. B. 1994. Why does *Escherichia coli* have two primary pathways for synthesis of glutamate? *J. Bacteriol.* 176:4664-4668.
- Hill, J. E., A. M. Myers, T. J. Koerner, and A. Tragoloff. 1986. Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 2:163-167.
- Hinnen, A., J. B. Hicks, and G. R. Fink. 1978. Transformation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:1929-1933.
- Holmes, A. R., A. Collins, K. J. Farnden, and M. G. Sheperd. 1989. Ammonium assimilation by *Candida albicans* and other yeasts: evidence for activity of glutamate synthase. *J. Gen. Microbiol.* 135:1423-1430.
- Hotzer, H., and S. Schneider. 1957. Anreicherung und Trennung einer DPN-spezifischen und einer TPN-spezifischen Glutaminsäure Dehydrogenase aus Hefe. *Biochem. Z.* 329:361-367.
- Hummelt, G., and J. Mora. 1980. Regulation and function of glutamate synthase in *Neurospora crassa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:1688-1694.
- Lomnitz, A., J. Calderón, G. Hernández, and J. Mora. 1987. Functional analysis of ammonium assimilation enzymes in *Neurospora crassa*. *J. Gen. Microbiol.* 133:2333-2340.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Marqués, S., F. J. Florencio, and P. Candau. 1992. Purification and characterization of the ferredoxin-glutamate synthase from the unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6301. *Eur. J. Biochem.* 206:69-77.
- Mezra, J. L., D. W. Tempest, and C. M. Brown. 1970. Glutamine (amide): 2-oxoglutarate aminotransferase oxidoreductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 64:187-194.
- Mifflin, B. J., P. J. Lea, and R. M. Wallsgrove. 1980. The role of glutamine in ammonium assimilation and re-assimilation in plants, p. 213-234. In J. Mora and R. Palacios (ed.), *Glutamine: metabolism, enzymology and regulation*. Academic Press, Inc., New York, N.Y.
- Miller, S. M., and M. Magasanik. 1990. Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 172:4927-4935.
- Moye, W. S., N. Amuro, J. K. M. Rao, and H. Zalkin. 1985. Nucleotide sequence of yeast *GDH1* encoding nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 260:8502-8508.
- Nagasu, T., and B. D. Hall. 1985. Nucleotide sequence of the *GDH1* gene coding for the NADP-specific glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 37:247-253.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Senior, P. J. 1975. Regulation of nitrogen metabolism in *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*: studies with the continuous-culture technique. *J. Bacteriol.* 123:407-418.
- Struhl, K., D. T. Stinchcomb, S. Scherer, and R. W. Davis. 1979. High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:1035-1039.
- Tempest, D. W., J. L. Meers, and C. M. Brown. 1970. Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochem. J.* 117:405-407.
- Valenzuela, L., S. Guzmán León, R. Coria, J. Ramírez, C. Aranda, and A. González. 1995. A NADP-glutamate dehydrogenase mutant of the pet1-negative yeast *Kluyveromyces fragilis* uses the glutamine synthetase-glutamate synthase pathway for glutamate biosynthesis. *Microbiology* 141:2443-2447.
- Wilkinson, B. M., C. M. James, and R. M. Walsley. 1996. Partial deletion of the *Saccharomyces cerevisiae GDH3* gene results in novel starvation phenotypes. *Microbiology* 142:1667-1673.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **Genetic Redundancy and the Adaptation to Facultative Metabolism in Yeast: The Existence of Two NADP-Glutamate Dehydrogenases is Compelling for Growth under Fermentative and Respiratory Conditions**

Alexander DeLuna, Lina Riego, Amaranta Avendaño,  
and Alicia González\*.

Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Apartado Postal 70-242, 04510  
México, D. F.

\*amanjarr@ifisiol.unam.mx

### **Abstract.**

The genome of *Saccharomyces cerevisiae* contains several duplicated regions. This redundancy phenomenon is probably the result of a single whole-genome duplication, as well as the occurrence of sporadic independent short-segment repeats. It has been proposed that the gross duplication might coincide with the origin of the ability to grow under anaerobic conditions. In this paper we review the analysis of the duplicated NADP- glutamate dehydrogenase pathway, which has shown that *GDH1* and *GDH3* play non-redundant roles under fermentative and respiratory conditions. These isoenzymes are specialized at the genetical and biochemical levels in a way such that glutamate biosynthesis is achieved without impairing the energy-providing pathways; the system modulates  $\alpha$ -ketoglutarate utilization. Duplication and further diversification of a biosynthetic glutamate dehydrogenase may be representative of a general mechanism through which this yeast acquired facultative metabolic properties.

### **About the Origin of the Duplicated Regions in the Yeast Genome**

Genetic redundancy is a major feature of living beings. Duplication of functional genes may represent the source of genetic material for the origin of new or specialized functions of the proteins they encode (Otha, 1989). It has long been known that the model organism *S. cerevisiae* harbors a high number of redundant genes. After analysis of the complete yeast genome sequence (Mewes et al., 1997), several interchromosomal duplicated regions were identified by Wolfe and Shields (1997). This blocks constitute the molecular evidence of an ancient duplication of the entire yeast genome. Most of the redundant copies would have been lost after this event, resulting in a modern degenerated tetraploid.

However, the actual structure of the *S. cerevisiae* genome cannot be solely explained by a single duplication event. Results of the partial sequencing of 13 hemiascomycetous yeast species (Feldmann, 2000) show that an overall degree of gene redundancy seems to be conserved across all

yeast species. This can be better explained by a dynamic equilibrium resulting from numerous events of gene duplication and deletion (Llorente et al., 2000). Therefore, besides an ancient polyploidization event, duplication of genomic blocks seems to be an ongoing feature of yeast evolution (Friedman and Hughes, 2001).

### **Genetic Redundancy and the Adaptation to Facultative Metabolism**

Apart from how gene redundancy happened, it is interesting to ask why it happened and why it has been conserved. It has long been considered that complete or partial duplication of a genome may have a profound impact on many organism's evolution (Ohno, 1970). However, the significance of yeast gene redundancy is not clear.

A single gross duplication can represent the possibility of a given organism to experiment the evolution of all proteins encoded in its genome, and this could be of particular importance in the adaptation to a "new" way of life. Wolfe and Shields (1997) pointed out that the whole genome duplication in *S. cerevisiae* may coincide with the origin of the ability to grow under anaerobic conditions. The estimated date of this event corresponds to the time when angiosperms and their fruit became abundant in the earth's flora. The progenitor of *S. cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis* was apparently an obligate aerobe; upon separation of this lineages, the former developed the ability to grow anaerobically (Møller, 2001). This step definitely required a major remodeling of the metabolic and regulatory mechanisms. It is possible that the gross genome duplication provided the basis for the specialization of a number of genes and their corresponding proteins, enabling optimal function under anaerobic conditions (Piškur, 2001).

It is estimated that approximately 8% of the genes in the pre-duplication *S. cerevisiae* genome have been retained in duplicate (Seoighe, 1998), so that duplicate pairs formed by polyploidy account for approximately 16% of the current gene set. The products of most of the duplicated genes seem to have conserved their original cellular role, as

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

the functional categories are different for only 26 of 280 duplicated pairs of genes for which a cellular role has been assigned (Seoighe, 1999). Are there functional categories for which duplicated genes are over-represented? Enzymes of glucose metabolism, cyclins and much of the signal transduction apparatus, heat-shock proteins, and cytosolic ribosomal protein genes, are actually over-duplicated (Seoighe, 1999). This fact suggests that there is some non-randomness or predetermination of the fates of duplicated genes.

Interesting to mention is the existence of several duplicated yeast genes whose genetic regulation has diverged, and which are differentially expressed under aerobic or anaerobic conditions (Kwast, 1998). For many isoenzymes, there is evidence of functional specialization. This is the case of the *URA7*- and *URA8*-encoded CTP synthetases (Nadkarni et al., 1995), the isocitrate dehydrogenase family (Zhao and McAlister-Henn, 1996), or the well-characterized yeast alcohol dehydrogenases.

#### **An Illustrative Case: The NADP-Glutamate Dehydrogenase Duplicated Pathway**

Studies on the biosynthetic glutamate dehydrogenases have shown how a duplicated gene can be retained to improve the efficiency with which a pre-existing function is carried out. Like most free living micro-organisms, *S. cerevisiae* possesses two pathways for ammonium assimilation and glutamate biosynthesis, the NADP<sup>+</sup>-specific glutamate dehydrogenase (NADP-GDH) (Holzer and Schneider, 1957), and the glutamine synthetase / glutamate synthase cycle (Tempest et al., 1970; Cogoni et al., 1995). The isolation of mutants altered in both *GDH1* and *GLT1* uncovered the fact that glutamate biosynthesis can also be afforded by an NADP-GDH isoenzyme encoded by *GDH3* (Avendaño et al., 1997).

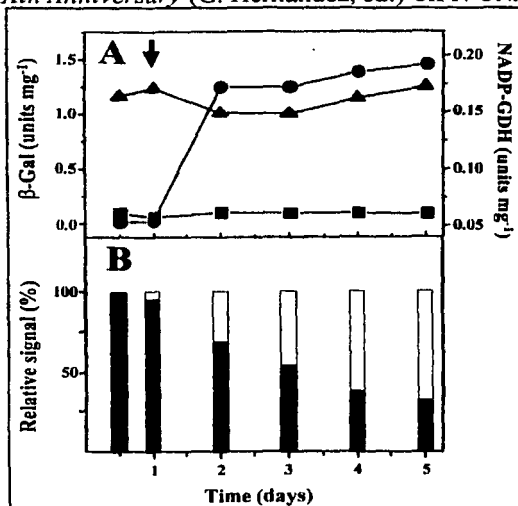
To understand the role of the duplicated NADP-GDH pathway present in *S. cerevisiae*, we purified both isoenzymes and studied their biochemical properties. The

structure of both Gdh1p and Gdh3p is hexameric, and our results show that the wild type enzyme is a natural mixture of several isoforms built up by the oligomerization of two monomers encoded by *GDH1* and *GDH3* (DeLuna et al., 2001). Native PAGE analysis of the protein purified from the wild type strain shows a smeared pattern, compared to the two sharp bands observed when a mixture of homomeric proteins is electrophoresed. SDS-PAGE electrophoresis of the protein purified from the wild type strain grown on ethanol shows two bands corresponding to Gdh1p and Gdh3p monomers. Densitometric analysis reveals that 73% of the total NADP-GDH is composed of Gdh1p while the remaining 27% corresponds to Gdh3p.

Enzymological properties were separately determined for the Gdh1p and Gdh3p homomeric NADP-GDHs, which differ in their allosteric properties and rates at which they use  $\alpha$ -ketoglutarate (DeLuna et al., 2001). Gdh3p exhibits a higher  $S_{0.5}$  value (substrate concentration at which rate equals half the  $V_{max}$ ) and  $n_H$  (Hill coefficient) compared to its homologue. Conversely, Gdh1p isoenzyme shows no considerable changes in sigmoidicity at different pH values; affinity for  $\alpha$ -ketoglutarate is always higher in terms of  $S_{0.5}$ . Interestingly, the heteromeric enzyme purified from the wild type strain exhibits kinetic parameters for  $\alpha$ -ketoglutarate similar to those of a preparation containing 75% Gdh1p and 25% Gdh3p homomeric enzymes. This indicates that kinetic behavior depends on the relative abundance of the *GDH1* and *GDH3*-encoded monomers (DeLuna et al., 2001).

To determine the relative levels of the NADP-GDHs under different conditions, extracts were prepared from cells obtained from different growth phases of long-term yeast cultures. In rich medium with glucose, *S. cerevisiae* grows by fermentation; diauxic shift occurs after glucose is exhausted from the medium and cells adapt to respiratory metabolism using the ethanol produced during fermentation (Fuge et al., 1994). In fermentative growth, activity is solely due to Gdh1p (Fig. 1). However, as cells proceed





**Figure 1. NADP-GDHs are differentially expressed during diauxic transition.** *A*, yeast cells were cultured by extended growth in rich medium with glucose. Aliquots were withdrawn at different times, and protein extracts from wild type strains CLA4-1 (*GDH1-lacZ* 2 $\mu$  *LEU2*) (■) and CLA4-2 (*GDH3-lacZ* 2 $\mu$  *LEU2*) (●) were assayed for  $\beta$ -Galactosidase activity ( $\beta$ -Gal). Average NADP-GDH activity is also shown (▲). One unit of  $\beta$ -Gal or NADPH activity is defined as one  $\mu$ mole of ONPG or NADPH oxidized per minute, respectively. Bold arrow indicates the time at which glucose is exhausted from the medium. *B*, the abundance of each isoenzyme relative to the total NADP-GDH was calculated from the normalized densitometric analysis of immunoblot signals obtained for electrophoresed protein extracts of the wild type strain. Black bars, Gdh1p; white bars, Gdh3p.

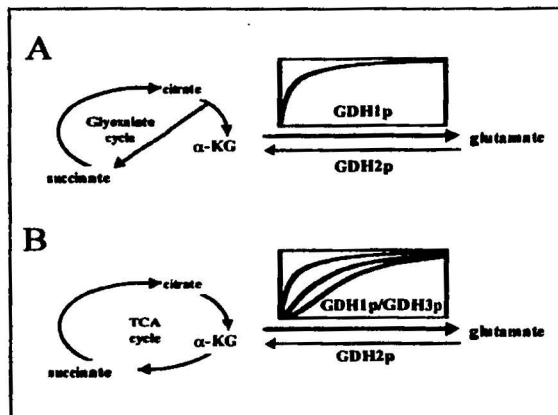
through post-diauxic growth, different Gdh1p:Gdh3p ratios are observed; after 5 days of incubation 79% of the total activity in the wild type strain corresponds to Gdh3p (Fig. 1B). To determine *GDH1* and *GDH3* expression, pertinent fusion plasmids were constructed. A low *GDH1* expression is maintained through the different growth phases, while that of *GDH3* is null during fermentative growth and increases 70-fold when cells enter the diauxic phase, and thus respiratory growth.

Although *GDH1* expression remains constant throughout the different growth phases, the relative amount of Gdh1p decreases (Fig. 1), this apparent discrepancy is explained considering previous observations indicating that NADP-GDH is proteolyzed after glucose starvation (Mazón and

Hemmings, 1979). Taken together, these results indicate that the relative abundance of Gdh1p or Gdh3p depends on the carbon source, and that *GDH3*-carbon dependent regulation is exerted at a transcriptional level.

The phenotypic characterization of *gdh1 $\Delta$  or *gdh3 $\Delta$ , and double *gdh1 $\Delta$ , *gdh3 $\Delta$  mutants shows that wild type growth on glucose is achieved through the action of Gdh1p. Mutants impaired in *GDH1* increase their doubling time, while *gdh3 $\Delta$  mutants show no phenotype (Avenidaño et al., 1997). Conversely, in ethanol-grown cultures, lack of either Gdh1p or Gdh3p results in slower growth with respect to the wild type strain (DeLuna et al., 2001); showing that these two enzymes play non-redundant roles and are needed to attain full growth on ethanol.*****

The intracellular concentration of  $\alpha$ -ketoglutarate was assayed in *gdh1 $\Delta$  or *gdh3 $\Delta$  mutants, and in wild type strains carrying plasmids over-expressing either *GDH1* or *GDH3*. The enzymatic activity of the *GDH2*-encoded catabolic NAD<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase was also measured. Results show that Gdh1p is the main catalyst of glutamate biosynthesis in glucose cultures, and that *in vivo*, Gdh1p has a higher utilization rate of  $\alpha$ -ketoglutarate than the heteromeric isoenzyme present in ethanol-grown cultures (DeLuna et al., 2001). These observations allow to pose the model depicted in Fig. 2. Under fermentative growth (glucose-grown cells)  $\alpha$ -ketoglutarate intracellular levels are determined through the concerted action of Gdh1p and Gdh2p; since *GDH3* is not expressed, Gdh3p plays no role. Energy is provided through glucose fermentation under this condition, and thus the high-rate activity of Gdh1p does not compromise energy yield. Under respiratory conditions (ethanol-grown cells), *GDH1* and *GDH3* are simultaneously expressed and a variety of isoenzymes can be built up depending on the Gdh1p:Gdh3p ratio. The functioning of the modulable heteromeric isoforms, constitutes a pacemaker mechanism in which the relative abundances of Gdh1p and Gdh3p results in glutamate biosynthesis and in a balanced utilization of  $\alpha$ -ketoglutarate**



**Figure 2:** A model for the NADP-GDH isoenzymes of *S. cerevisiae*. When yeast is grown on a fermentable carbon source such as glucose (A), the tricarboxilic acid cycle enzymes after  $\alpha$ -ketoglutarate are repressed (Liu et al., 1999), and the use of  $\alpha$ -ketoglutarate for glutamate biosynthesis is achieved through the action of the non-modulable GDH1-encoded NADP-GDH. When grown on a nonfermentable carbon source such as ethanol (B), the use of  $\alpha$ -ketoglutarate for respiratory metabolism is prioritized, and glutamate biosynthesis from this precursor is modulated by the presence of different NADP-GDH isoenzymes. TCA cycle, tricarboxilic acid cycle;  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -ketoglutarate.

under respiratory conditions. Gdh2p reconstitutes the  $\alpha$ -ketoglutarate pool when a pertinent glutamate pool is attained. The metabolic circuit including GDH1, GDH3, and GDH2, besides constituting pathways involved in ammonium utilization, plays a fundamental role in determining the intracellular levels of energy-yielding molecules. Glutamate dehydrogenases are an important connecting point between carbon and nitrogen metabolisms.

#### Concluding Remarks

NADP-glutamate dehydrogenase in yeast is encoded by two duplicated genes which have undergone specialization at the genetical and biochemical level. This specialization is necessary for optimal growth under fermentative and respiratory conditions. The gross-genome duplication seems to coincide with the origin of the ability to grow under anaerobic conditions. Therefore, duplication and further functional specialization of a biosynthetic glutamate dehydrogenase seems to be representative of a general mechanism through which this yeast adapted to facultative metabolism. Global analysis of the expression of duplicated genes, together with phenotypic characterization of mutants impaired in redundant copies, is indispensable to determine whether this is the case.

#### References

- Avendaño A, DeLuna A, Olivera H, Valenzuela L, and González A (1997) *J. Bact.* 179:5594–5597
- Cogoni C, Valenzuela L, González-Halphen D, Olivera H, Macino G, Ballario P, and González A (1995) *J. Bacteriol.* 177:792–798
- DeLuna A, Avendaño A, Riego L, and González A (2001) *J. Biol. Chem.* (epub ahead of print) 10.1074/jbc.M107986200
- Feldmann H (2000) *FEBS Lett.* 487:1–2
- Friedman R, and Hughes AL (2001) *Genome Res.* 11:373–381
- Fuge EK, Braun EL, and Werner-Washburne M (1994) *J. Bacteriol.* 176:5802–5813
- Holzer H, and Schneider S (1957) *Biochem. Z.* 328:361–367
- Kwast KE, Burke PV, Poyton RO (1998) *J. Exp. Biol.* 201:1177–1195
- Liu Z, and Butow RA (1999) *Mol. Cell. Biol.* 19:6720–6728
- Llorente B, Durrens P, Malpertuy A, Aigle M, Artiguenave F, Blandin G, Bolotin-Fukuhara M, Bon E, Brottier P, Casaregola S, et al. (2000) *FEBS Lett.* 487:122–133
- Mazón MJ, and Hemmings BA (1979) *J. Bacteriol.* 139:686–689
- Mewes HW, Albermann K, Bahr M, Frishman D, Gleissner A, Hani J, Heumann K, Kleine K, Maierl A, Oliver SG, et al. (1997) *Nature* 387(Suppl):7–65
- Møller K, Olsson L, and Piškur J (2001) *J. Bact.* 183:2485–2489
- Nadkarni AK, McDonough VM, Yang WL, Stucky JE, Ozier-Kalogeropoulos O, and Carman GM (1995) *J. Biol. Chem.* 270:24982–24988
- Ohno S (1970). *Evolution by Gene Duplication*. George Allen and Unwin, London.
- Otha T (1989) *Genome* 1:304–310
- Piškur J (2001) *Trends Genet.* 17:302–303
- Seoighe C, and Wolfe KH (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:4447–4452
- Seoighe C, and Wolfe KH (1999) *Curr. Opin. Microbiol.* 2:548–554.
- Tempest DW, Meers JL, Brown CM (1970) *Biochem. J.* 117:405–407
- Wolfe KH, and Shields DC (1997) *Nature* 387:708–713
- Zhao WN, and McAlister-Henn L (1996) *Biochemistry* 35:7873–7878

**TITLE:**

**Transcription analysis of the NADP-glutamate dehydrogenase (*GDH*) of *Saccharomyces cerevisiae*. Positive regulation by *gln3*, *gcn4* and *hap4* during respiratory growth**

**AUTHORS:**

**Lina Riego, Amaranta Avendaño, Alexander DeLuna, Ekaterina Rodríguez and Alicia González\***

**Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, 04510 Mexico City México**

**Running title: *GDH* transcriptional regulation.**

**Keywords: NADP-glutamate dehydrogenase, glutamate biosynthesis, carbon and nitrogen metabolism.**

**Subject category: Genetics and Molecular Biology**

- **\*Corresponding author**
- **TEL +52 (55) 56225631**
- **FAX +52 (55) 56225630**
- **E-mail: amanjarr@ifisiol.unam.mx**

**Abbreviations:**

**GDH, glutamate dehydrogenase**

**GS, glutamine synthetase**

**GOGAT, glutamate synthase**

**$\beta$ -Gal,  $\beta$ -galactosidase**

**3-AT, 3-aminotriazole**

**SUMMARY**

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, two NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase isoenzymes encoded by *GDH1* and *GDH3* catalyze the synthesis of glutamate from ammonium and  $\alpha$ -ketoglutarate. In this work we analyzed *GDH1* transcriptional regulation, in order to deepen the studies in regard to its physiological role. Plasmid *GDH1-lacZ* fusions were constructed and  $\beta$ -galactosidase activity was determined in the cells grown on glucose or ethanol and various nitrogen sources. Strains carrying null mutations in either *GCN4*, *GLN3*, *GAT1/NIL1*, *UGA43/DAL80*, *MIG1,2*, *HAP2*, *HAP3*, *HAP4*, *GCN5*, *ADA2*, *ADA3*, *SPT3* or *SNF2* were examined for the possible role of these factors in *GDH1-lacZ* expression. A collection of increasingly larger 5' deletion derivatives of the *GDH1* promoter was also constructed to search for DNA sequences that could be involved in transcriptional regulation. Our results indicate that: (i) *GDH1* expression is strictly controlled in ethanol-grown cultures, indicating that the regulation of *GDH1* in this physiological condition constitutes a fine-tuning mechanism controlling the abundance of Gdh1p monomers, ii) *GDH1* expression is controlled by transcriptional activators which have been considered as exclusive of either nitrogen (Gln3p and Gcn4p) or carbon metabolism (HAP complex), and (iii) chromatin remodeling complexes play a role in *GDH1* expression; *ADA2* and *ADA3* up-regulated *GDH1* expression on ethanol, while that on glucose was only *ADA3*-dependent. *SPT3* and *SNF2* activated *GDH1* expression on either carbon source whereas *GCN5* played no role in any condition tested. This combinatorial control results in a refined mechanism that coordinates carbon and nitrogen utilization.

**INTRODUCTION**

In yeasts and filamentous fungi, two types of glutamic dehydrogenase (GDH) enzymes catalyze the interconversion of ammonia and glutamate (Holzer & Schneider, 1957). Those using NAD<sup>+</sup> as cofactor have been assigned a catabolic role, while those using NADP<sup>+</sup> have been shown to play a biosynthetic role. The existence of an alternative pathway for the net biosynthesis of glutamate was demonstrated by Tempest *et al.* (1970). In this pathway, glutamate is aminated to form glutamine by the *GLN1*-encoded glutamine synthetase (GS), the amide group of which is then transferred reductively to  $\alpha$ -ketoglutarate by glutamate synthase (GOGAT), resulting in the net conversion of ammonium and  $\alpha$ -ketoglutarate to glutamate. In *Saccharomyces cerevisiae*, besides the NADP-GDH enzyme encoded by *GDH1*, and GOGAT encoded by *GLT1* (Cogoni *et al.*, 1995), there is a third route for glutamate biosynthesis constituted by a *GDH3*-encoded isoenzyme (Avendaño *et al.*, 1997). Thus, in this microorganism, mutations inactivating *GDH1*, *GLT1* and *GDH3* are needed to attain full glutamate auxotrophy (Avendaño *et al.*, 1997).

The purification and characterization of *GDH1*- and *GDH3*-encoded enzymes, and heteromers of these two, showed that these enzymes have distinct metabolic roles, different allosteric properties, and rates of  $\alpha$ -ketoglutarate utilization (DeLuna *et al.*, 2001). It was also shown that the expression of *GDH1*, *GDH3* and *GDH2* (encoding the catabolic NAD-GDH) expression is coordinately regulated by the carbon source (Coschigano *et al.*, 1991; DeLuna *et al.*, 2001). These findings indicate that glutamate biosynthesis and catabolism could provide a mechanism that modulates the utilization of  $\alpha$ -ketoglutarate under fermentative and respiratory

conditions without impairing the integrity of the connected energy-providing systems (DeLuna *et al.*, 2001).

Isolation and physiological characterization of GOGAT-less mutants led Cogoni *et al.* (1995) to propose that GOGAT constitutes an ancillary pathway for glutamate biosynthesis that contributes to the maintenance of the metabolic pool of this amino acid. Since the GS/GOGAT pathway links  $\alpha$ -ketoglutarate and glutamine metabolism, it has been suggested to play a regulatory link between carbon/energy and nitrogen metabolism (Flores-Samaniego *et al.*, 1993; Van Riel *et al.*, 1998). In *Escherichia coli* regulation of the GS/GOGAT pathway is crucial to control nitrogen metabolism and the levels of  $\alpha$ -ketoglutarate and glutamine constitute the signal that coordinately regulates carbon and nitrogen metabolism (Ninfa *et al.*, 2000). Altogether, these observations indicate that a metabolic circuit that includes *GDH1*, *GDH3*, *GDH2*, *GLN1* and *GLT1*-encoded enzymes, besides constituting the biosynthetic pathways involved in ammonium assimilation, glutamate and glutamine biosynthesis, also plays a fundamental role in determining the intracellular levels of a variety of cofactors and energy yielding molecules (DeLuna *et al.*, 2001; Flores-Samaniego *et al.*, 1993; Van Riel *et al.*, 1998). Consequently, inquires on the regulatory mechanisms determining the expression of this set of genes must consider this additional and crucial role.

Even though the *GDH1*-encoded NADP-GDH is the main catalyst for glutamate biosynthesis, its expression, mainly studied in glucose grown cultures, is regulated by the HAP complex (Dang *et al.*, 1996), *LEU3*- (Hu *et al.*, 1995) and *GLN3*-encoded proteins (Daugherty *et al.*, 1993). Considering recent findings on the different roles

that *GDH1*- and *GDH3*-encoded isoenzymes may play under fermentative and respiratory conditions (DeLuna *et al.*, 2001), we undertook a comparative analysis of the transcriptional regulation of *GDH1* in either glucose or ethanol-grown cells. The results herein described show that Gcn4p, Gln3p and the HAP complex regulate *GDH1* expression in ethanol-grown cultures, and indicate that different chromatin remodeling and transcriptional complexes are involved in *GDH1* expression in glucose- and ethanol-grown cells.

## METHODS

**Strains.** The following strains were transformed according to the method described by Ito *et al.* (1983), with either pLIN1 (*GDH1-lacZ* 2 $\mu$  *LEU2*) or pLIN10 (*GDH1-lacZ* 2 $\mu$  *URA3*): CLA1, CLA-100, CLA-102 (Valenzuela *et al.*, 1998), CLA-302-0 (Valenzuela *et al.*, 2001), 27034b, 30078c (Coornaert *et al.*, 1992), YM4797, YM4968 (Lutfiya *et al.*, 1998), BWG1-7A, LWG1, JP40 (Forsburg & Guarente, 1989) FY2, FY293, FY1656 (Sterner *et al.*, 1999) PSY316, PSY316-ada2 (Berger *et al.*, 1992), PSY316-gcn5, PSY316-ada3 (Koleske *et al.*, 1992), Y0000 and Y04959 (Euroscarf Collection) generating strains listed in Table 1. Construction of strain CLA-300 (*MAT $\alpha$  ura3 leu2* /p180 *GCN4-lacZ CEN4 ARS1 URA3* /pRS315 *CEN6 ARS4 LEU2*) has been previously reported (Valenzuela *et al.*, 2001).

**Growth conditions.** Strains were routinely grown on minimal medium (MM) containing salts, trace elements, and vitamins following the formula of yeast nitrogen base (Difco). Filter sterilized glucose (2%) or ethanol (2%) were used as carbon sources, and 0.2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or 0.1% glutamate, glutamine, or proline were used as the nitrogen source. Amino acids needed to satisfy auxotrophic requirements

were added at 0.01% (wt/vol). Cells were incubated at 30°C with shaking (250 rpm). For amino acid deprivation experiments, CLA1-1 and CLA-300 strains were inoculated into 10 ml YPD, incubated at 30°C with shaking for 6 h, washed twice, and resuspended in MM. Aliquots were inoculated into 100 ml of MM to give an optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) of 0.05. Cultures were incubated at 30°C for 6 h, harvested, resuspended in 10 ml of MM, and inoculated into 100 ml of MM to give an  $OD_{600}$  of 0.2 and into 100 ml of MM-10mM 3-aminotriazole (3-AT) to give an  $OD_{600}$  of 0.5. After 6 h of incubation at 30°C with shaking (250 rpm), cultures were centrifuged and used for  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -Gal) determinations.

**Determination of  $\beta$ -Gal activities.** Total yeast extracts were prepared from cultures inoculated at an  $OD_{600}$  of 0.05 and harvested at an OD between 0.3 and 0.5. Cells were washed twice with distilled water and once with the appropriate extraction buffer (Rose & Botstein, 1983). The pellet was stored at -20°C until used. Soluble extracts were prepared by suspending whole cells in extraction buffer and grinding them with glass beads in a Vortex mixer.  $\beta$ -Gal activities were determined by the method described by Rose & Botstein (1983).  $\beta$ -Gal specific activity was expressed as nanomoles of *o*-nitrophenol produced per minute per milligram of protein. Protein was measured by the method of Lowry *et al.* (1951), with bovine serum albumin as a standard.

**Construction of *lacZ* fusions.** Complementation of a *gdh1 $\Delta$*  (MAR1) mutant (Valenzuela *et al.*, 1998) with a YCp50 genomic library led to select plasmid pCRII. Sequencing of the 8 Kb fragment present in pCRII confirmed that *GDHI* gene was carried by this plasmid. In order to construct a *lacZ* fusion with

the *GDHI* promoter, we followed the procedure described by Dang *et al.* (1996), a 964 *Hind*III fragment including the *GDHI* promoter and 27 bp corresponding to the 9 N-terminal codons of *GDHI* was obtained by digesting plasmid pCRII (Fig. 1). This fragment was fused in frame to the *E. coli lacZ* of YEp363 (2 $\mu$  *LEU2*) or YEp353 (2 $\mu$  *URA3*) (Myers *et al.*, 1986) generating pLIN1 and pLIN10 respectively. To obtain a 5' *GDHI* promoter deletion series, the pertinent forward deoxyoligonucleotides were designed based on the *GDHI* promoter sequence. Deoxyoligonucleotide R1 (5'-GCG CGA AGC TTG TTG AAA TTC TGG C-3') was used as the reverse deoxyoligonucleotide in order to amplify the 6 individual deletions. Qiagen purified pLIN1 DNA was used as a template for PCR amplification, carried out in a Stratagene Robocycler 40 with the following program: one denaturing cycle for 3 min at 95°C, followed by 5 cycles of 1 min denaturation at 95°C, 1 min annealing at 52°C and 2 min extension at 72°C and 25 cycle of 1 min denaturation at 95°C, 1 min annealing at 68°C and 2 min extension at 72°C finally 5 min extension at 72°C. The entire family of PCR products were fused in frame to the *E. coli lacZ* gene of Yep363 (2 $\mu$  *LEU2*) (Myers *et al.*, 1986), generating 6 fusion plasmids, pLIN2 through pLIN7. All fusion plasmids were sequenced with an ABI PRISM Genetic Analyzer, using the ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit from Applied Biosystems.

**Primer extension RNA analysis.** Primer extension reactions were performed by standard procedures (Sambrook *et al.*, 1989). To determine chromosomal *GDHI* transcription initiation sites, total RNA was isolated from the wild type strain CLA1, grown on MM with 0.2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as the nitrogen source. A deoxyoligonucleotide containing 20 nucleotides of

the *GDH1* coding sequence was prepared and used in the primer extension reactions. The transcription initiation sites present in the *lacZ* fusion plasmid pLIN1 were also determined. Primer extension reactions were carried out with total RNA extracted from strain CLA1-1 grown MM with 0.2%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  as the nitrogen source and a deoxyoligonucleotide containing 20 nucleotides of the *lacZ* coding region.

## RESULTS

**Regulation of *GDH1* expression by nitrogen and carbon sources.** NADP-GDH activity and *GDH1* expression are diminished when yeasts are grown in the presence of a variety of amino acids as nitrogen sources, and glucose as carbon source (Hu *et al.*, 1995; Roon & Even, 1973). We determined  $\beta$ -Gal activity in a wild type strain harboring plasmid pLIN1, containing the *GDH1* promoter fused to the complete  $\beta$ -Gal coding region. In the presence of either glucose or ethanol as carbon sources, maximal *GDH1* transcriptional activity was found when ammonium was used as sole nitrogen source (Table 2). When ammonium was substituted for proline, glutamate or glutamine,  $\beta$ -Gal activity was decreased, although this effect was more evident when ethanol was the carbon source. These results indicate, that in ethanol-grown cells, *GDH1* expression was negatively regulated by a variety of amino acids regardless of whether these were glutamate rich or poor nitrogen sources. This is consistent with the fact that glutamate is the donor of amino nitrogen in the biosynthesis of most amino acids, and that *GDH1* is the main pathway involved in glutamate biosynthesis (Avenidaño *et al.*, 1997).

In extracts of ethanol-grown cells,  $\beta$ -Gal activity fostered by *GDH1* (Table 2) was three-fold higher, as compared to that found on ammonium/glucose

cultures. Such an increase, however, did not correspond to an equivalent increment of NADP-GDH activity (Dang *et al.*, 1996). This effect has been attributed to the fact that NADP-GDH activity was determined in a wild type strain, harboring *GDH1* and *GDH3* encoded NADP-GDH activity, and it was speculated that a differential expression pattern for *GDH1* or *GDH3* could account for the observed discrepancy (Dang *et al.*, 1996). However, a similar NADP-GDH activity was observed in extracts from a *gdh3* null mutant grown on glucose or ethanol on several nitrogen sources (data not shown). These results confirmed that ethanol-induced *GDH1* expression does not result in higher enzymatic activity and suggests the existence of a posttranscriptional regulatory mechanism, which remains to be identified.

**Effect of Gln3p, Gat1p/Nil1p, Gcn4p, Dal80p/Uga43p, Mig1,2p transcriptional regulators on *GDH1* expression.** Primer extension analysis performed with total RNA extracted from either the CLA1 wild type strain or the CLA1-1 strain harboring plasmid pLIN1 defined three transcription initiation sites at +1, +5, and +15 (Fig. 2), that grossly correspond to those previously determined at -12, -8, and +1 (Moye *et al.*, 1985). A putative TATA box was localized at -86, while Moye *et al.* (1985) localized this element at -40.

Examination of the *GDH1* promoter sequence revealed a canonical Gcn4p binding site, ATGACTC [*GCN4*<sup>(3)</sup>], and three noncanonical binding sites: TGATTC [*GCN4*<sup>(1)</sup>], CACTCA (complementary to TGAGTG) [*GCN4*<sup>(2)</sup>] and TGACTT [*GCN4*<sup>(4)</sup>] (Fig. 1), suggesting that *GDH1* expression could be directly controlled by Gcn4p. The impairment of Gcn4p had no effect on *GDH1* basal expression on glucose, while it clearly affected *GDH1* ethanol-

induced expression (Table 3). To address if *GDHI* expression was regulated during amino acid deprivation by the Gcn4p-mediated general amino acid control (Hinnebusch, 1988),  $\beta$ -Gal activity was determined in extracts from cultures of the wild type strain carrying pLIN1, grown in the presence or absence of 3-AT, a competitive inhibitor of His3p. In the presence of this analogue, cells become deprived of histidine.  $\beta$ -Gal activity was slightly lower in extracts obtained from glucose-grown cultures treated with 3-AT, as compared to that from cells grown in the absence of this analogue (Table 4). These results indicate that *GDHI* is not regulated by the general amino acid control during amino acid deprivation on glucose. *GDHI* expression of ethanol-grown cells in the presence of 3-AT was similar to that found on ethanol alone, showing that *GDHI* transcription did not respond to histidine deprivation in either glucose or ethanol. Accordingly,  $\beta$ -Gal activity fostered by the translational *GCN4-lacZ* gene fusion (Hinnebusch, 1985) increased ten-fold after 3-AT treatment in ethanol-grown cultures, as compared to that found on glucose without 3-AT (Table 4). These results indicate that translation of *GCN4* mRNA is equally increased in the presence of either 3-AT or ethanol and that the presence of both elicitors does not show additivity.

The *GDHI* promoter contains five GATAA sequences, four of which have been previously described (Daugherty *et al.*, 1993): GATAAA [GATA<sup>(1)</sup>], GATAAG [GATA<sup>(2)</sup>], CTTATC (complementary to GATAAG) [GATA<sup>(3)</sup>], CTTATC (complementary to GATAAG) [GATA<sup>(4)</sup>], and GTTATC (complementary to GATAAC) [GATA<sup>(5)</sup>] (Fig. 1). These sequences can constitute the *cis*-acting elements, UAS<sub>NTR</sub>, acting as binding site(s) for two transcriptional activators, Gln3p and

Gat1p/Nil1p, known to regulate the expression of nitrogen-modulated genes (Blinder & Magasanik, 1995; Coffman *et al.*, 1997; Courchesne & Magasanik, 1988; Minehart & Magasanik, 1991; Stanbrough & Magasanik, 1996). These sites could also have a role in down regulation of nitrogen-controlled gene expression exerted by the GATA family member Dal80p/Uga43p. The Dal80p binding site, URS<sub>GATA</sub>, consists of a pair of GATA containing sequences oriented tail to tail or head to tail (Cunningham & Cooper, 1993). The *GDHI* promoter harbors two of the above mentioned GATA sequences oriented tail to tail [GATA<sup>(2)</sup>/GATA<sup>(3)</sup>], and two pairs oriented head to tail [GATA<sup>(3)</sup>/GATA<sup>(4)</sup> and GATA<sup>(4)</sup>/GATA<sup>(5)</sup>] (Fig. 1). However, the distance between the first and the third pair (110 bp and 99 bp, respectively) is much larger than that proposed for the Dal80p binding site (15 to 35 bp); the 29 bp distance between the second pair is within the proposed range.

The lack of Dal80p/Uga43p or Gat1p/Nil1p, had no effect on *GDHI* expression in either glucose- or ethanol-grown cells. The impairment of Gln3p diminished  $\beta$ -Gal activity in extracts obtained from glucose-grown cells. However, it had a more severe effect on *GDHI* expression in ethanol-grown cells, in which a ten-fold lower  $\beta$ -gal activity was obtained as compared to that found in the wild type strain (Table 3).

As mentioned earlier, *GDHI* expression is glucose-repressed and highly induced in the presence of non-fermentable carbon sources. Expression analysis of the *hap3* null mutant and three mutants affected in the HAP elements located at the *GDHI* promoter, led to the proposal that this regulation is exerted by the HAP complex (Dang *et al.*, 1996). Confirming this results, impairment of either *HAP2* or *HAP3* resulted



in a decreased  $\beta$ -Gal activity fostered by *GDH1-lacZ* gene fusion in extracts obtained from glucose grown cells, while the *hap4* null mutant showed no effect on  $\beta$ -Gal activity. Impairment of either *HAP2*, *HAP3* or *HAP4* strongly diminished *GDH1*-dependent  $\beta$ -Gal activity in ethanol-grown cells (Table 3).

A region of the *GDH1* promoter, between -554 and -543, contained a *MIG1,2*-like binding element (Fig. 1) (Luftiya *et al.*, 1998) indicating that glucose repression of *GDH1* expression could be mediated through the action of Mig1,2p. Yet, the lack of these transcriptional regulators had no effect on *GDH1* expression in either glucose or ethanol (Table 3).

The above results show that *GDH1* transcription of yeast cells grown on glucose is regulated by Gln3p, Hap2p and Hap3p; however, the lack of these effectors has a more dramatic effect on ethanol-grown cells. Furthermore, results show that Gcn4p- and Hap4p-mediated regulation is only observed in ethanol grown yeast cells.

**Regulation of *GDH1* expression by chromatin remodeling factors.** Perturbation of nucleosomal organization at promoter regions occurs prior to or during activation facilitating the function of the transcription complex. The Swi-Snf complex identified in yeast has been shown to remodel chromatin "in vivo" and to stimulate the binding of activators and basal factors to nucleosomal DNA (Peterson & Tamkun, 1995). To learn if the Swi-Snf complex is involved in *GDH1* expression,  $\beta$ -Gal activity was determined in a wild type strain and in a *snf2* null mutant, both transformed with plasmid pLIN10.  $\beta$ -Gal activity was several-fold lower in the mutant as compared to that found in the wild type strain in extracts from both, glucose and ethanol-grown cells (Table 5). These results show that the

Swi-Snf complex is readily involved in *GDH1* transcriptional regulation.

In vitro studies have shown that histone acetylation increases the binding of transcriptional activators to their sites in nucleosomal DNA. Two distinct Gcn5p-dependent histone acetyltransferase complexes have been identified in *S. cerevisiae*; the SAGA (Spt-ADA-Gcn5-Acetyltransferase and the ADA (ADA-Gcn5-acetyltransferase) complex (Eberharther *et al.*, 1999). To determine if *GCN5*, *ADA2*, *ADA3* or *SPT3* play a role in *GDH1* expression, plasmid pLIN1 was introduced into *gcn5 $\Delta$* , *ada2 $\Delta$* , *ada3 $\Delta$*  and *spt3 $\Delta$*  mutant strains and  $\beta$ -Gal activity was determined. The lack of Spt3p or Ada3p affected *GDH1* expression in extracts obtained from either glucose or ethanol (Table 5). These results show that the SAGA complex participates in *GDH1* transcriptional regulation. Lack of Ada2p only affected ethanol-induced *GDH1* expression, but a *gcn5* null mutation had no effect on *GDH1* expression on either glucose or ethanol. Even though the SAGA complex includes Gcn5p, apparently not all SAGA-dependent promoters are affected by Gcn5p-dependent acetylation (Lee *et al.*, 2000). These results indicate that different members of the SAGA remodeling complex regulate *GDH1* expression.

**Deletion analysis of *GDH1* promoter.** A collection of 5' deletions of increasing size affecting the *GDH1* promoter was constructed as described in Methods. When a wild type strain harboring pLIN2, which lacks the most 5' 226 bp of the *GDH1* promoter, was grown on ammonium-glucose,  $\beta$ -Gal activity was higher than that obtained with the wild type strain carrying plasmid pLIN1 (Fig. 3). This increment was more evident in yeasts grown on ammonium with ethanol as carbon source, a condition in which  $\beta$ -Gal activity was 2.2-fold higher than that found in the

wild type strain carrying pLIN1. These results suggest that a target for negative regulation (upstream repressing region 1 [URR1]) was missing in pLIN2. Loss of the neighboring 60 bp (pLIN3) resulted in an almost two-fold decrease in  $\beta$ -Gal activity on both glucose and ethanol as compared to that fostered by pLIN2, suggesting that the GATA<sup>(1)</sup> box lost in pLIN3 may play a role in *GDH1* expression. The loss of a second URR localized between -582 and -522 (pLIN4), doubled  $\beta$ -Gal activity (Fig. 3).  $\beta$ -Gal activity fostered by pLIN5 was two-fold decreased as compared to that fostered by pLIN4, suggesting that the GATA<sup>(2)</sup> box could also play a role in *GDH1* transcriptional activation. A further 5' extended deletion construct (pLIN7) fostered  $\beta$ -Gal activity which was half-fold lower to that found with the full promoter (pLIN1), suggesting that the GATA<sup>(5)</sup> and GCN4<sup>(4)</sup> sites, could be determining *GDH1* expression from this plasmid. Strains harboring constructs from pLIN1 through pLIN4 showed lowest  $\beta$ -Gal activity in the presence of glucose and glutamate, increasing gradually as nitrogen and carbon repression were relieved, the highest expression being attained on ethanol plus ammonium. These results show that carbon repression is stronger than that exerted by the nitrogen source. Most interesting is the fact that strains harboring plasmids pLIN5 and pLIN6 failed to show repression by glutamate (Fig. 3); however, sequences that could participate in glutamate repression were not identified and further analysis will be needed to determine these *cis*-acting elements. The net increase in  $\beta$ -Gal activity in ethanol grown cultures was evident in all deletion constructs, suggesting that this effect could be dependent on the GATA<sup>(5)</sup> and or GCN4<sup>(4)</sup> *cis* elements or in a so far unidentified element which was retained in pLIN7 construct.

A *gcn4* null mutant was transformed with pLIN1 through pLIN7, and  $\beta$ -Gal activity was determined. As Fig. 3 shows,  $\beta$ -Gal expression was not affected in glucose grown cultures, while that determined in ethanol diminished from two to six-fold. Strain harboring plasmid pLIN7 showed decreased  $\beta$ -Gal activity, indicating that the GCN4<sup>(4)</sup> *cis*-acting element could play an important role in *GDH1* expression, thus confirming that Gcn4p up-regulates *GDH1* expression in ethanol.

A *gln3* null mutant showed decreased  $\beta$ -Gal activity in each one of the strains harboring the collection of 5' deletion constructs, except for the glucose-grown cultures of strain harboring pLIN7. The ethanol-induction effect was strongly decreased in all constructs, suggesting that Gln3p plays an important positive role in this induction. These results also indicate that the GATA<sup>(5)</sup> *cis*-acting element, present in pLIN7, could have a role in Gln3p-mediated transcriptional activation in ethanol-grown cultures.

## DISCUSSION

The finding that *S. cerevisiae* possesses two genes coding for NADP-GDH isozymes brought up to discussion whether this duplication results in a redundancy of function. Recent studies have shown that *GDH1*- and *GDH3*-encoded enzymes have distinct roles and together with Gdh2p, they provide a mechanism resulting in a balanced utilization of  $\alpha$ -ketoglutarate under fermentative and respiratory conditions (DeLuna *et al.*, 2001).

While it has been clearly shown that the *GDH3*-encoded enzyme has a several-fold higher enzymatic activity in ethanol-grown cultures as compared to that found on glucose-grown cultures (DeLuna *et al.*, 2001), the *GDH1*-encoded enzymatic activity

appeared to be similar in either glucose or ethanol-grown cultures (Dang *et al.*, 1996; DeLuna *et al.*, 2001). Results herein presented confirm that *GDHI* expression is induced in ethanol, although this differential expression does not result in a correspondingly higher NADP-GDH enzymatic activity (Table 2), indicating the existence of posttranscriptional regulatory mechanisms. In this regard it was found that when *GDHI* or *GDH3* expression was fostered by the same promoter, in glucose grown cultures, Gdph1p activity was five-fold higher to that of Gdh3p, while in ethanol-grown cultures Gdh1p activity was only two-fold higher as compared to that of Gdh3p (DeLuna *et al.*, 2001). Thus, the possibility that *GDHI* and *GDH3* transcripts could have a differential stability or translation rate in ethanol vs glucose could be interpreted as indicating that in ethanol-grown cultures a higher amount of *GDHI* mRNA is needed in order to attain a pertinent concentration of Gdh1p. This would allow the organization of a NADP-GDH (Gdh1p/Gdh3p) isoenzyme with an appropriate rate of  $\alpha$ -ketoglutarate utilization (DeLuna *et al.*, 2001).

Increased *GDHI* expression in ethanol was found to be Gln3p, Gcn4p and HAP-dependent. Our results also show that Gln3p plays a role in carbon-dependent regulation (Table 3). Recent findings obtained from the study of whole-genome transcription profiling, led to the proposition that proteins of the TOR signaling pathway communicate with transcription factors as part of a nutrient-response network (Kuruvilla *et al.*, 2001). It was considered that Gln3p was mainly involved in the nitrogen discrimination pathway, while Gat1p played this role in the carbon discrimination pathway. Our results show that Gln3p and Gat1p could have overlapping functions, since *GDHI* carbon-induced

expression is Gln3p-dependent, while Gat1p plays no role in this regulation. To our knowledge, *GDHI* is the first example of a gene whose carbon regulation is *GLN3*-dependent. As mentioned earlier, these findings strengthen the notion that ammonium assimilation constitutes the link between carbon and nitrogen regulation.

The HAP complex regulates *GDHI* expression in glucose grown cultures (Dang *et al.*, 1996). However, it is intriguing that this complex, which has been considered to regulate genes involved in respiratory metabolism, is also able to regulate *GDHI* expression under fermentative growth. Far more intriguing is the fact that Hap4p, which constitutes the activation domain of the HAP complex, does not affect *GDHI* regulation (Table 3). Dang *et al.* (1996), also reported an increase in *GDHI* expression when *S. cerevisiae* is grown on non-fermentable carbon sources; however, the nature of the transcriptional activators involved in this response was not pursued. Our results confirm that Hap4p is not involved in glucose-dependent regulation, but that it does play a role in *GDHI* expression in ethanol-grown cultures (Table 3). Thus, in glucose-grown cells, the HAP complex operates in a Hap4p independent manner, while in ethanol the entire HAP complex is involved in *GDHI* expression. These results agree with those of Liu *et al.* (1999), who proposed that under respiratory metabolism, the  $\alpha$ -ketoglutarate yielding enzymes are HAP regulated. The *GDHI*-encoded enzyme, being regulated by the HAP complex, could form part of a HAP-regulated network determining synthesis and utilization of  $\alpha$ -ketoglutarate. Most of the genes encoding amino acid biosynthetic enzymes in *S. cerevisiae* are subject to the general amino acid control mediated by Gcn4p (Hinnebusch, 1988).

Since *GDH1* expression is partially determined by Leu3p, it was proposed that this regulatory element could constitute an indirect mechanism through which Gcn4p could control *GDH1* expression (Hu *et al.*, 1995). Results presented in this paper (Fig. 3, Table 3) demonstrate that Gcn4p does not regulate *GDH1* expression in glucose-grown cultures, but plays a crucial role in *GDH1* regulation in ethanol-grown cultures. This is in agreement with previous observations showing that glucose starvation stimulates *GCN4* translational expression, through a different mechanism to that elicited by amino acid limitation (Yang *et al.*, 2000). The fact that *GCN4* translation is similarly increased in ethanol and 3-AT, but that *GDH1* expression is only induced by ethanol (Table 4), possess an interesting question in regard to the mechanisms determining the selective induction of *GDH1* by Gcn4p, which remains unsolved. However, it could be speculated that the chromatin organization of the *GDH1* promoter could be relaxed in ethanol-grown cultures thus increasing the accessibility of Gcn4p to its target sites.

Analysis of mutants altered in genes involved in chromatin remodeling indicate that not all of the members of the SAGA complex affect transcription in ethanol vs glucose, since *ada2* null mutations only affects ethanol-induced expression (Table 5). Alternatively, it could be speculated that a population of SAGA-like complex lacking Ada2p could also be organized. A *gcn5* null mutation gave no phenotype in either glucose or ethanol-grown cultures (Table 5). In this regard, it has been recently shown (Bhaumik & Green, 2001) that in strains lacking *GCN5*, *GAL1* transcription occurred at wild type levels. These data indicate that individual SAGA components are differentially required for the transcription of a given gene. Our results also

suggest that either *GDH1* expression is not regulated by acetylation or that the TAF<sub>II</sub>145 histone acetylase present in the TFIID transcription complex could play this role (Lee *et al.*, 2000).

Results presented throughout this paper indicate that *GDH1* expression in ethanol is highly regulated, and are in agreement with the role that has been assigned to the Gdh1p and Gdh3p NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes (DeLuna *et al.*, 2001). It has been shown that Gdh1p, Gdh3p and the heteromeric Gdh1p/Gdh3p, present in ethanol-grown cultures, show different rates of  $\alpha$ -ketoglutarate utilization. This constitutes a pacemaker mechanism in which the relative abundances of Gdh1p and Gdh3p results in glutamate biosynthesis and in a balanced utilization of  $\alpha$ -ketoglutarate under respiratory conditions (DeLuna *et al.*, 2001). It is tempting to speculate that the stringent regulation of *GDH1* expression in ethanol-grown cultures determines the amount of Gdh1p present in this condition, and also the overall Gdh1p/Gdh3p ratio.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge, Cristina Aranda for skillful technical assistance, Lourdes Valenzuela for helpful discussions, to the Molecular Biology Unit of the Instituto de Fisiología Celular for the synthesis of deoxyoligonucleotides, and Fernando Bastarrachea for his critical review of the manuscript. We also thank Allan Hinnebusch for kindly providing plasmid p180. Bruno Andre, Mark Jhonston and Leonard Guarente, for providing yeast strains. This work was supported in part by the DGAPA, Universidad Nacional Autónoma de México (IN212898), and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (31774-N). L. R. received a fellowship

and two grants (PAEP-201371 and 102358) from the Dirección General de Estudios de Posgrado, UNAM.

## REFERENCES

- Avendaño, A., DeLuna, A., Olivera, H., Valenzuela, L. & González, A. (1997). *GDH3* encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**, 5594-5597.
- Berger, S. L., Piña, B., Silverman, N., Marcus, G. A., Agapite, J., Regier, J. L., Triezenberg, S. J. & Guarente, L. (1992). Genetic isolation of ADA2: a potential transcriptional adaptor required for function of certain acidic activation domains. *Cell* **70**, 251-265.
- Bhaumik, S. R. & Green, M. R. (2001). SAGA is an essential in vivo target of the yeast acidic activator Gal4p. *Genes Dev* **15**, 1935-1945.
- Blinder, D. & Magasanik, B. (1995). Recognition of nitrogen-responsive upstream activation sequences of *Saccharomyces cerevisiae* by the product of the *GLN3* gene. *J Bacteriol* **177**, 4190-4193.
- Coffman, J. A., Rai, R., Loprete, D. M., Cunningham, T. S., Svetlov, V. & Cooper, T. G. (1997). Cross regulation of four GATA factors that control nitrogen catabolic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**, 3416-3429.
- Cogoni, C., Valenzuela, L., González-Halphen, D., Olivera, H., Macino, G., Ballario, P. & González, A. (1995). *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *J Bacteriol* **177**, 792-798.
- Coornaert, D., Vissers, S., Andre, B. & Grenson, M. (1992). The *UGA43* negative regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* contains both a GATA-1 type zinc finger and a putative leucine zipper. *Curr Genet* **21**, 301-307.
- Coschigano, P. W., Miller, S. M. & Magasanik, B. (1991). Physiological and genetic analysis of the carbon regulation of the NAD-dependent glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **11**, 4455-4465.
- Courchesne, W. E. & Magasanik, B. (1988). Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of the *URE2* and *GLN3* genes. *J Bacteriol* **170**, 708-713.
- Cunningham, T. S. & Cooper, T. G. (1993). The *Saccharomyces cerevisiae* *DAL80* repressor protein binds to multiple copies of GATAA-containing sequences (URS<sub>GATA</sub>). *J Bacteriol* **175**, 5851-5861.
- Dang, V. D., Bohn, C., Bolotin-Fukuhara, M. & Daigan-Fornier, B. (1996). The CCAAT box-binding factor stimulates ammonium assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*, defining a new cross-pathway regulation between nitrogen and carbon metabolisms. *J Bacteriol* **178**, 1842-1849.
- Daugherty, J. R., Rai, R., Berry H. M. E. & Cooper, T. G. (1993). Regulatory circuit for responses of nitrogen catabolic gene expression to the *GLN3* and *DAL80* proteins and nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **175**, 64-73.
- DeLuna, A., Avendaño, A., Riego, L. & González, A. (2001). NADP-glutamate dehydrogenase isoenzymes of *Saccharomyces cerevisiae*. Purification, kinetic properties and physiological roles. *J Biol Chem* **10.1074/jbc.M107986200**.
- Eberharter, A., Sterner, D. E., Schieltz, D., Hassan, A., Yates, J. R. 3<sup>rd</sup>, Berger, S. L. & Workman, J. L. (1999). The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**, 6621-6631.
- Flores-Samaniego, B., Olivera, H. & González, A. (1993). Glutamine synthesis is a regulatory signal controlling glucose catabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **175**, 7705-7706.
- Forsburg S. L. & Guarente, L. (1989). Identification and characterization of *HAP4*: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes Dev* **8**, 1166-1178.
- Hinnebusch, A. G. (1985). A hierarchy of transacting factors modulates translation of an activator of amino acid biosynthetic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **5**, 2349-2360.
- Hinnebusch, A. G. (1988). Mechanism of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **52**, 248-273.

- Holzer, H. & Schneider, S. (1957).** Anreicherung und Trennung einer DPN-spezifischen und einer TPN-spezifischen Glutaminsäure Dehydrogenase aus Hefe. *Biochem Z* **329**, 361-367.
- Hu, Y., Cooper, T. G. & Kohlhaw, G. B. (1995).** The *Saccharomyces cerevisiae* Leu3 protein activates expression of *GDH1*, a key gene in nitrogen assimilation. *Mol Cell Biol* **15**, 52-57.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1983).** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-168.
- Koleske, A. J., Buratowski, S., Nonet, M. & Young, R. A. (1992).** A novel transcription factor reveals a functional link between the RNA polymerase II, CTD and TFIID. *Cell* **69**, 883-894.
- Kuruville, F. G., Shamji, A. F. & Schreiber, S. L. (2001).** Carbon- and nitrogen-quality signaling to translation are mediated by distinct GATA type transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 7283-7288.
- Lee, T. H., Causton, H. C., Holstege, F. C. P., Shen, W., Hannett, N., Jemmings, E. G., Winston, F., Green, M. R. & Young, R. A. (2000).** Redundant roles for the TFIID and SAGA complexes in global transcription. *Nature* **405**, 701-704.
- Liu, Z. & Butow, R. (1999).** A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Mol Cell Biol* **19**, 6720-6728.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Lutfiya, L. L., Iyer, V. R., DeRisi, J., DeVit, M. J., Brown, P. O. & Jhonston, M. (1998).** Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **150**, 1377-1391.
- Minchert, P. L. & Magasanik, B. (1991).** Sequence and expression of *GLN3*, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol Cell Biol* **11**, 6216-6228.
- Moye, W. S., Amuro, N., Rao, J. K. M. & Zalkin, H. (1985).** Nucleotide sequence of yeast *GDH1* encoding nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase. *J Biol Chem* **260**, 8502-8508.
- Myers, A. M., Tzagaloff, A., Kinney, D. M. & Lusty, C. J. (1986).** Yeast shuttle integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of *lacZ* fusions. *Gene* **45**, 299-310.
- Ninfa, A. J., Jiang, P., Atkinson, M. R. & Peliska, J. A. (2000).** Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Curr Top Cell Regul* **36**, 31-75.
- Peterson, C. L. & Tamkun, J. W. (1995).** The SWI-SNF complex: a chromatin remodeling machine? *TIBS* **20**, 143-146.
- Roon, R. J. & Even, H. L. (1973).** Regulation of the nicotinamide adenine dinucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **116**, 367-372.
- Rose, M. & Botstein, D. (1983).** Construction and use of gene fusions to *lacZ* ( $\beta$ -galactosidase) that are expressed in yeast. *Methods Enzymol* **101**, 167-180.
- Sambrook, K. J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Stanbrough, M. & B. Magasanik, B. (1996).** Two transcription factors, Gln3p and Nil1p, use the same GATAAG sites to activate the expression of *GAP1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **178**, 2465-2468.
- Sterner, D. E., Grant, P. A., Roberts, S. M., Duggan, L. J., Belotserkovskaya, R., Pacella, L. A., Winston, F., Workman, J. L. & Berger, S. L. (1999).** Functional organization of the yeast SAGA complex: distinct components involved in structural integrity, nucleosome acetylation, and TATA-binding protein interaction. *Mol Cell Biol* **19**, 86-98.
- Tempest, D. W., Meers, J. L. & Brown, C. M. (1970).** Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *Biochem J* **117**, 405-407.
- Van Riel, N. A. W., Giuseppin, M. L. F., TerSchure, E. G. & Verrips, C. T. (1998).** A structured, minimal parameter model of the central nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the prediction of the behaviour of mutants. *J Theor Biol* **191**, 397-414.
- Valenzuela, L., Ballario, P., Aranda, C., Filetici, P. & González, A. (1998).** Regulation of expression of *GLT1*, the gene encoding glutamate synthase in

*Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **180**, 3533-3540.

Valenzuela, L., Aranda, C. & González, A. (2001). TOR modulates *GCN4*-dependent expression of genes turned on by nitrogen limitation. *J Bacteriol* **183**, 2331-2334.

Yang, R., Wek, S. A. & Wek, R. C. (2000). Glucose limitation induces *GCN4* translation by activation of Gcn2 protein kinase. *Mol Cell Biol* **20**, 2706-2717.

## FIGURE LEGENDS

**FIGURE. 1.** *GDH1* promoter sequence. Putative Gcn4p (*GCN4*), Gln3p and Gat1p (*GATA*), *MIG1*-like, HAP complex (HAP) and Leu3p (*LEU3*) binding sites and poly(dA-dT) regions are boxed and numbered starting from the most 5'. A putative TATA box as well as the three transcription initiation sites, at positions +1, +5, and +15, are indicated. *HindIII* sites were used to clone this fragment into the 2 $\mu$  *LEU2 lacZ* vector YEp363 and the 2 $\mu$  *URA3 lacZ* vector YEp353 generating plasmids pLIN1 and pLIN10.

**FIGURE. 2.** Primer extension analysis. Representative results of primer extension analysis of the *GDH1* gene carried out with total RNA obtained from either the wild type strain CLA1 or from the strain CLA1-1 transformed with plasmid pLIN1 (Lane 1). The sequence ladder was produced with the same deoxyoligonucleotides used for the primer extension reaction (described in Methods).

**FIGURE. 3.**  $\beta$ -Gal activities of 5' deletions of the *GDH1* promoter. The *GDH1* full promoter and 5' deletions were cloned into the 2 $\mu$  *LEU2 lacZ* vector YEp363, generating plasmids pLIN1 through pLIN7. These plasmids were transformed into the wild type strain CLA1, *gcn4* $\Delta$  CLA100 and *gln3* $\Delta$  CLA101 mutants. The 5' region carried in each plasmid is

indicated in rows pLIN1 to pLIN7. The reported  $\beta$ -Gal activities are averages of values obtained in three independent experiments, activity was determined in extracts obtained from cells grown on either 0.2% ammonium sulfate or 0.1% glutamate as nitrogen sources with 2% glucose or 2% ethanol as carbon sources. ND, not determined. Diagrams depict Gcn4p putative binding sites (O), Gln3p putative binding sites ( $\triangleright, \triangleleft$ ), Mig1,2p putative binding site ( $\blacklozenge$ ), HAP complex putative binding sites ( $\blacksquare$ ), Leu3p putative binding site ( $\text{shaded square}$ ), poly (dA-dT) ( $\blacksquare$ ), putative TATA box (\*), transcription initiation sites ( $\rightarrow$ ), and putative URRs (.....).

**Table 1.** *S. cerevisiae* strains used in this study

Strain	Genotype
CLA1-1	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2/pLIN1 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> LEU2)</i>
CLA 100-1	<i>MAT<math>\alpha</math> gcn4<math>\Delta</math>::URA3 leu2/pLIN1 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> LEU2)</i>
CLA 102-1	<i>MAT<math>\alpha</math> gat1<math>\Delta</math>::URA3 leu2/pLIN1 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> LEU2)</i>
CLA 302-0-1	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3 leu2 gln3<math>\Delta</math>::Kan MX4/pLIN1 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> LEU2)</i>
27034b-10	<i>MAT<math>\alpha</math> UGA43 ura3 leu2::LEU2/pLIN10 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> URA3)</i>
30078c-10	<i>MAT<math>\alpha</math> uga43<math>\Delta</math>::LEU2 ura3/pLIN10 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> URA3)</i>
YM4797-10	<i>MAT<math>\alpha</math> met? can? tyr1-501 ura3-52 ade2-101 lys2-801 MIG1 MIG2/pLIN10 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> URA3)</i>
YM4968-10	<i>MAT<math>\alpha</math> met? can? tyr1-501 ura3-52 ade2-101 lys2-801 mig2<math>\Delta</math>::HIS3 mig1<math>\Delta</math>::Kan MX4/pLIN10 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> URA3)</i>
BWG1-7A-1	<i>MAT<math>\alpha</math> ade1-100 leu2-112 ura3-52 his4-519 HAP2 HAP3/pLIN1 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> LEU2)</i>
LWG1-1	<i>MAT<math>\alpha</math> ade1-100 leu2-112 ura3-52 his4-519 hap2-1 HAP3/pLIN1 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> LEU2)</i>
JP40-1	<i>MAT<math>\alpha</math> ade1-100 leu2-112 ura3-52 his4-519 HAP2 hap3-1/pLIN1 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> LEU2)</i>
Y0000-1	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math> 1 leu2<math>\Delta</math> 0 met15<math>\Delta</math> 0 ura3<math>\Delta</math> 0 HAP4/pLIN1 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> LEU2)</i>
Y04959-1	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math> 1 leu2<math>\Delta</math> 0 met15<math>\Delta</math> 0 ura3<math>\Delta</math> 0 hap4<math>\Delta</math> ::Kan MX4/pLIN1 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> LEU2)</i>
FY2-10	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 SPT3 SNF2/pLIN10 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> URA3)</i>
FY293-10	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 spt3<math>\Delta</math>202 lys2-173R2 his4-917<math>\delta</math> SNF2/pLIN10 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> URA3)</i>
FY1656-10	<i>MAT<math>\alpha</math> ura3-52 SPT3 his3<math>\Delta</math>200 leu2<math>\Delta</math>1 snf2<math>\Delta</math>::LEU2/pLIN10 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> URA3)</i>
PSY316-1	<i>MAT<math>\alpha</math>. ADA2 ADA3 GCN5 ura3-52 lys2-801 leu2-3, 112 ade2-101 his3-<math>\Delta</math>200/pLIN1 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> LEU2)</i>
PSY316-ada2-1	<i>MAT<math>\alpha</math> ada2::hisG ADA3 GCN5 ura3-52 lys2-801 leu2-3, 112 ade2-101 his3-<math>\Delta</math>200/pLIN1 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> LEU2)</i>
PSY316-gcn5-1	<i>MAT<math>\alpha</math>. ADA2 ADA3 gcn5::hisG ura3-52 lys2-801 leu2-3, 112 ade2-101 his3-<math>\Delta</math>200/pLIN1 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> LEU2)</i>
PSY316-ada3-1	<i>MAT<math>\alpha</math>. ADA2 ada3::hisG GCN5 ura3-52 lys2-801 leu2-3, 112 ade2-101 his3-<math>\Delta</math>200/pLIN1 (GDH1-lacZ 2<math>\mu</math> LEU2)</i>



**Table 2.**  $\beta$ -Gal specific activity in different carbon and nitrogen sources.

Growth Conditions	Sp act (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )*	
	Glucose	Ethanol
Ammonium	3600	9900
Proline	2806	5500
Glutamate	2550	5780
Glutamine	2556	3500

\* Mean of three independent experiments. Variations were  $\leq 15\%$ .

**Table 3.**  $\beta$ -Gal specific activity in mutants altered in various transcriptional activators

Strains <sup>†</sup>	Sp act (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ) <sup>*</sup>	
	Glucose	Ethanol
CLA1-1/pLIN1	3600	9900
CLA100-1 <i>gcn4</i> $\Delta$ /pLIN1	4000	2160
CLA302-0-1 <i>gln3</i> $\Delta$ /pLIN1	1000	1000
CLA102-1 <i>gat1</i> $\Delta$ /pLIN1	4800	8860
27034b-10 <i>UGA43</i> /pLIN10	7900	19280
30078c-10 <i>uga43</i> $\Delta$ /pLIN10	8370	18790
YM4797-10 <i>MIG1 MIG2</i> /pLIN10	6080	10410
YM4968-10 <i>mig1</i> $\Delta$ <i>mig2</i> $\Delta$ /pLIN10	7790	15970
BWG1-7A-1 <i>HAP2 HAP3</i> /pLIN1	8550	15630
LWG1-1 <i>hap2-1 HAP3</i> /pLIN1	1690	1570
JP40-1 <i>HAP2 hap3-1</i> /pLIN1	3100	2240
Y0000-1 <i>HAP4</i> /pLIN1	6720	22630
Y04959-1 <i>hap4</i> $\Delta$ /pLIN1	7650	11510

\* Mean of three independent experiments. Variations were  $\leq$  15%

<sup>†</sup> Only relevant genotype is shown

**Table 4.**  $\beta$ -Gal specific activity under basal and amino acid deprivation conditions

Growth Conditions	Sp act (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )*			
	CLA1-1 <sup>†</sup>		CLA-300 <sup>†</sup>	
	(GDH1/pLIN1 GDH1-lacZ 2 $\mu$ LEU2)		(GDH1/p180 GCN4-lacZ URA3)	
	Glucose	Ethanol	Glucose	Ethanol
Ammonium	3600	9900	39	370
Ammonium + 3-AT <sup>§</sup>	2640	10000	465	480

\* Mean of three independent experiments. Variations were  $\leq$ 15%.

<sup>†</sup> Only relevant genotype is shown.

<sup>§</sup> 10mM 3-aminotriazole.

**Table 5.** Effect of chromatin remodeling factors in  $\beta$ -Gal activity.

Strain <sup>†</sup>	Sp act (nmol min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )*	
	Growth Condition	
	Glucose	Ethanol
PSY316-1( <i>GCN5 ADA2 ADA3</i> )/pLIN1	4900	16380
PSY316-gcn5-1 ( <i>gcn5 ADA2 ADA3</i> )/pLIN1	5690	14830
PSY316-ada2-1 ( <i>GCN5 ada2 ADA3</i> )/pLIN1	4770	4930
PSY316-ada3-1 ( <i>GCN5 ADA2 ada3</i> )/pLIN1	760	940
FY2-10 ( <i>SPT3 SNF2</i> )/pLIN10	9520	15580
FY293-10 ( <i>SPT3 snf2Δ</i> )/pLIN10	2250	2250
FY1656-10 ( <i>spt3Δ SNF2</i> )/pLIN10	1370	1210

\* Mean of three independent experiments. Variations were  $\leq 15\%$ .

<sup>†</sup> Only relevant genotype is shown

**HindIII**

-870 -820  
**AGCTTCGAAA**CTTCTCTTAATGATGGACTCTTCGACAGTAACAAACTAGCACACCGAA  
**TTCGAAGCTTTTGAAGAGA**ATACTACTACCTGAGAAGCTGTCATGTGTTGATCGTGTGGCTT

-810 **GCN4<sup>(1)</sup>**  
 GCTCCCGCAAGAAGGAGATGAACTTCTTTAGGTTCAAGTCCGCTAAACTCTACAGT**GAT**  
 CGAGGGCTGTCTTCTCTACTTGAAGAAA**TCCAAGTTCAGGCGATTTGAGATGCTACTA**

-750 -700  
**TCGTCCAGCATTGGCTTTTTTCTTGAAT**TATTTCTAGCGGGCTGTGGCCAGTATACCAA  
 AGACAGGTCGTAACCGAAAAAAGAACTTAATAAGATCGCCCGACACCGGT**CATATGGTT**

-690 -640  
 CCGAGCCAAACCATATTAGTAACTCCATT**CAGTATAAAGTGGC**ACTGCTT**CATGGGGCTG**  
 GGCTCGGTTTGGTATAATCATTGAGGTAAGTCATATTTACCGTGACGAAGTACCCCGAC

**GATA<sup>(1)</sup>** -580  
**CGATAAAGAGT**CCTAGAAGACCATGCGTTCGAGT**CGATCTGGGCA**CCACTCCGCATCTGG  
 GCTATTCTCAGGATCTTCTGGTACGCAAGCTCAGCTAGACCCGTGGT**GAGCGTAGACC**

-570 **MIG1-like** **GATA<sup>(2)</sup>**  
 GCATAACCTGAATTATACAAC**AATAACGTTGGGG**GAGGGCATCGTTTACGATTGGCT**GGAT**  
 CGTATTGGACTTAATATGTTGTTATTGCACCCCTCCCGTAGCAAATGCTAACCGACTA

-510 **GCN4<sup>(2)</sup>** -460  
**AAGAGGATTT**CATAAGGAATATGATGCTACAT**CGACTCAGGTCATTATTCTCTAGTGTAT**  
 TTCTCCTAAAGTATTTCTTATACTACGATG**TAGGTGAGTCCAGTAA**TAAAGAGATCACATA

-450 **GCN4<sup>(3)</sup>** **GATA<sup>(3)</sup>**  
 CAGGCTCCCTTATGCAAGGTTCCAT**TGACTC**CATGGAACGGGCTGATCTTAATAACCTT  
 GTCCGAGGGGAATACGTCCAAGGTACTGAGGTACCTTTGCCCGACTAGAAATATT**GGAA**

-390 **HAP<sup>(1)</sup>** **GATA<sup>(4)</sup>** **HAP<sup>(2)</sup>** **LEU3**  
 ATCTGACCATGATTTGGATGGCCTCGATATCTTATCGCAGAA**CCAATGC**CGCG**GAACC**  
**TAGACTG**TAGACT**TAACC**TACCGAGCTATA**GAATAG**CGTCTTGGT**TACGCGGCTTTGG**

-330 **poly(dA-dT)<sup>(1)</sup>** **HAP<sup>(3)</sup>**  
 GGGCCATGCATTTT**CAGT**CGGTGGGG**CAATAAAAAAGAAATA**GTACGACCCCA**CGTCCA**  
 CCGG**TACGTAAAAGT**CACGCCACCCCG**TATTTTTCTTTAT**CATGCTGGGGT**GCAGGT**

-270 **GATA<sup>(5)</sup>** -220  
**ATCAGCAGAGAGAAGCTGTTAT**CAGCTGCTGCGCGTTTTCTTTT**CATCAGGT**ACCATA  
 TAGTCGTCTCTCTCGA**CAATAG**TCGACGACGCGGGCAAAAAGAAAAGTAGTCCATGGTAT

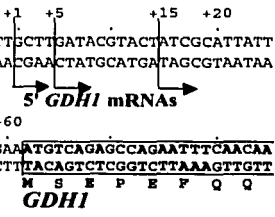
-210 -160  
 ATGAAAATCAGCACTGAAAAATTGCGGAAGAAGAAAGCGTAAAGAAGTAGCAGCAAAAGGCC  
 TACTTTAGTCGTGACTTTTTAACGCCTTCTCTTT**CGCATCTTCATCGCTGTTTCCGG**

-150 -100  
 GGCTCTTGTTAAAGCAAAGTATACGTAATCTAAGTAAGAGAAGATTGGAAAAATTTCTG  
 CCGAAGAACAATTT**CGTT**CATATG**CATTAGATTCA**TTCTCTTCTAA**CCTTTAAAGAGC**

-90 **TATA** -40  
 TTTTT**CATATATAAA**ATATACGAGAGTTACAAATGCGT**TTACCCATTTTATAT**TTCTCTCA  
 AAAAA**TATATATTTATAT**GCTCTCAATGTTTACGCAAA**TGGTAAAATATA**AGAGAT

-30 **GCN4<sup>(4)</sup>**  
 CTCTTAAAT**GACTT**TTCTTATAGCATTGAAAGTT**CTTGATACG**TACTATCGCATTATT  
 GAGAAATTTACTGAAAAGAAATATCGTAACTTT**CAAGAACTATGCATGATAGCGTAAATA**

+30 +60  
 CTAATATAACAGTTAGGAGACCAAAAAGAAAAGAA**ATGT**CAGAGCCAGAA**TTTCAACAA**  
 GATTATATTTGCTCAATCTCTGGTTTTTCTTTTTCTTT**TCAGTCTCGGCTTAAAGTTGTT**

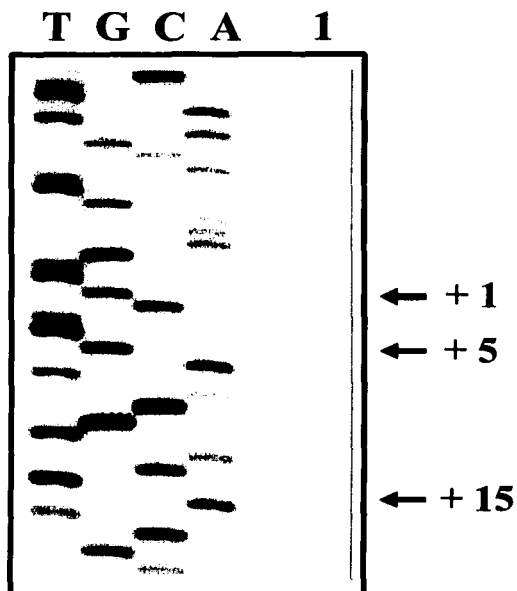


GCTT  
 CGAA  
 A Y

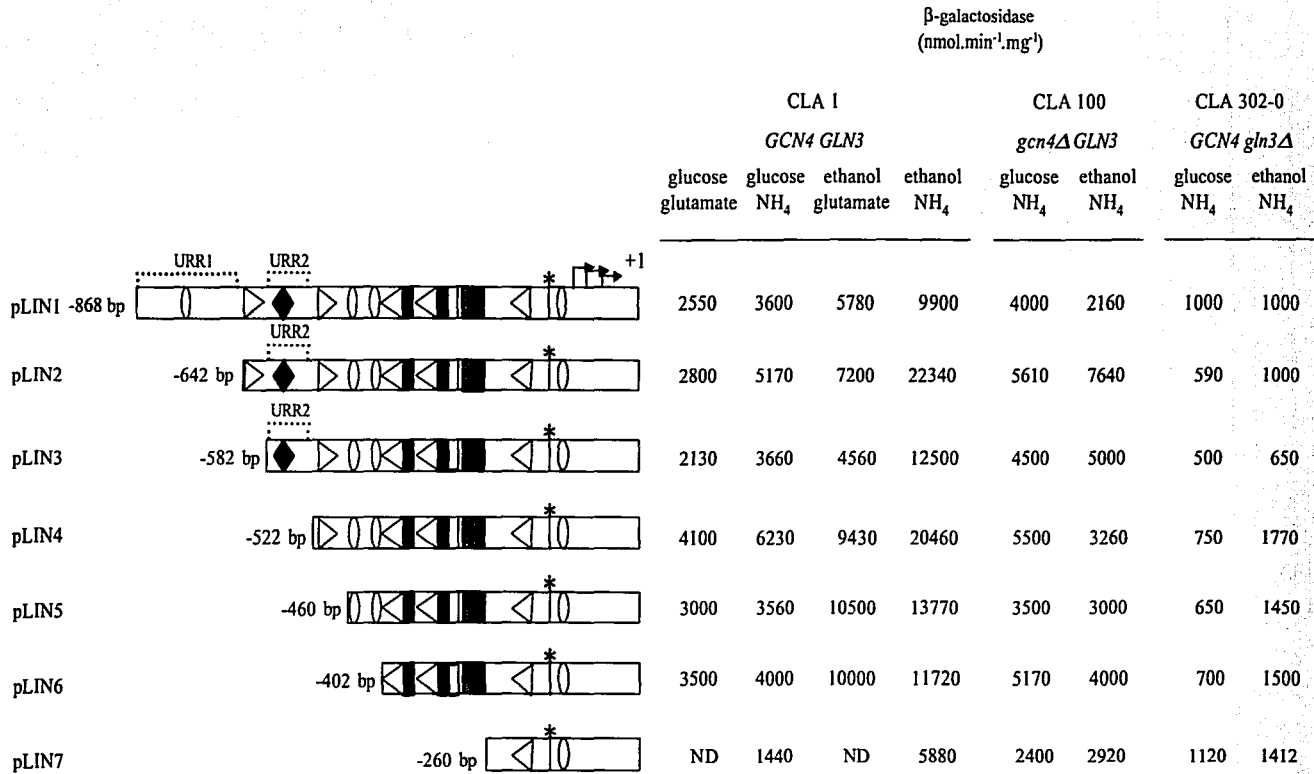
**HindIII**

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

Fig. 2



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON  
 FALTA DE ORIGEN

Fig. 3

## La desamidación espontánea de proteínas *in vitro* e *in vivo*

*Alexander de Luna Fors*

*Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-242, México D.F. 04510, México*

### INTRODUCCIÓN

*Desamidación e integridad de proteínas in vitro* – La desamidación espontánea es uno de los mecanismos responsables de la degradación y el envejecimiento de proteínas en condiciones fisiológicas (Aswad, 1995), ya que este fenómeno puede alterar la integridad estructural de un polipéptido y resultar en la pérdida de su actividad biológica. Esta modificación covalente no enzimática suele ocurrir en los residuos de asparagina (Asn), y se da por la vía intramolecular de la succinimida (Figura 1).

Existen varios factores que influyen sobre la frecuencia con la que una proteína experimenta una desamidación de este tipo, de tal forma que no es posible conocer de antemano esta tendencia por la simple secuencia de una cadena peptídica. En el caso de péptidos o proteínas *in vitro*, los factores más importantes tienen que ver con los diferentes niveles de la estructura y con el ambiente de la solución, tales como: i) la naturaleza del residuo aminoacídico del lado carboxilo de la Asn, ii) la flexibilidad de la región peptídica donde ésta se encuentra, iii) el ambiente molecular hidrofóbico/hidrofílico, iv) la temperatura, v) el pH de la solución, y vi) la naturaleza y concentración del amortiguador.

Por razones que no son del todo claras, pero que pueden involucrar la flexibilidad

única que los residuos de glicina (Gly) confieren a una cadena peptídica, las secuencias Asn-Gly son particularmente lábiles en este sentido, seguidas en menor grado por los pares Asn-serina. Por el contrario, son los residuos voluminosos y de naturaleza hidrofóbica los que confieren mayor estabilidad al péptido, cuando se encuentran del lado carboxilo de la Asn (Brennan y Clarke, 1995; Johnson y Aswad, 1995). En cuanto a la estructura de la proteína, se sabe que la rigidez de la cadena peptídica puede brindar cierta estabilidad, mientras que ciertos cambios conformacionales inducidos por la unión al ligando pueden facilitar la desamidación por la vía de la succinimida (Ota y Clarke, 1989; Sun *et al.*, 1992). En el caso de la triosa fosfato isomerasa, Gracy *et al.* (1995) reportan que los residuos de Asn en un microambiente hidrofílico son más susceptibles.

La tendencia a la desamidación espontánea *in vitro* por la vía de la succinimida aumenta a altas temperaturas y a pH elevado. Además, el tipo y concentración del amortiguador en cuestión también pueden acelerar el fenómeno por un efecto de catálisis básica general (Brennan y Clarke, 1995).

En muchos casos, la desamidación de una proteína puede tener efectos importantes sobre su actividad biológica. Sin embargo, no existe una regla general para predecir el efecto que cierta



desamidación pudiera tener sobre la proteína en cuestión, por lo que es importante estudiar cada caso en lo particular (Teshima *et al.*, 1995). El efecto dependerá de dónde se encuentre la Asn en la arquitectura de la proteína, éste puede ser de dos naturalezas principales: i) una pérdida o disminución de la actividad dependiente de unión al ligando por la interferencia de una nueva carga negativa, y ii) una desestabilización de la estructura de la proteína, ya sea por la presencia de una carga diferente en las zonas de estabilización de la estructura terciaria y cuaternaria, o por la formación de residuos isoaspartil que cambien la forma en que se orienta la cadena polipeptídica en cierto sitio.

*Recambio y envejecimiento de proteínas in vivo* – La importancia del efecto de la desamidación no enzimática de residuos de Asn sobre la degradación de proteínas no fue reconocida sino hasta hace relativamente poco tiempo, considerándose anteriormente la oxidación de residuos de metionina y de cisteína como el único factor importante en este sentido. Son Robinson y Rudd (1974) quienes estudian por primera vez los factores implicados en la desamidación de péptidos sintéticos.

El hecho de que los polipéptidos tiendan a experimentar una desamidación de esta naturaleza, puede ser usado para apoyar la hipótesis de este proceso como un mecanismo iniciador de la degradación de proteínas, con lo cual también se asume que el evento ocurre *in vivo* de manera significativa. De hecho, se han encontrado similitudes entre la vida media de ciertas proteínas *in vivo* y su velocidad de

desamidación *in vitro* (Aswad, 1995). La importancia del fenómeno *in vivo* se hace aún más notoria con el descubrimiento en eucariontes de una enzima que metila selectivamente el  $\alpha$ -carboxilo de isoaspartato, lo cual funciona como un mecanismo de reparación protéica (Aswad, 1984). Esto implica que la formación de isoaspartato por la vía de la succinimida es un evento significativo en la vida de algunas proteínas *in vivo*.

De esta manera se ha abierto un fascinante campo de investigación, pues se ha logrado relacionar directamente la desamidación espontánea con el proceso de envejecimiento de proteínas. Un mecanismo que muestra la importancia del fenómeno sobre el envejecimiento de proteínas es el caso de las proteínas del lente óptico de vertebrados (Takemoto, 1995). Este es un ejemplo interesante, ya que las proteínas de las capas medulares del lente no son sujetas a recambio, por lo que su deterioro incide directamente sobre el envejecimiento del tejido que forman.

Por otra parte, existen varios estudios sobre el proceso de desamidación de algunas enzimas en microorganismos, y son muchas las pistas sobre el efecto que ésta puede tener sobre su actividad biológica *in vivo*. Tal es el caso de la enzima triosa fosfato isomerasa, donde se sabe que la desamidación es un mecanismo que desencadena la proteólisis de la enzima (Gracy *et al.*, 1995). Más aún, la enzima que ha llevado a cabo más ciclos de reacción es más susceptible a la desamidación, por lo que se ha propuesto un interesante mecanismo de uso y deshecho molecular (*molecular wear and tear*). En este y otros casos, la

desamidación juega un papel importante en la vida media y el recambio de las enzimas del metabolismo central.

*Análisis de la susceptibilidad teórica a la desamidación espontánea de las glutamato deshidrogenasas de Saccharomyces cerevisiae* – La glutamato deshidrogenasa anabólica (NADP-GDH), una enzima que se encuentra ampliamente distribuida en todos los grupos filogenéticos, es la vía principal para la biosíntesis de glutamato en microorganismos. A la fecha, no tenemos noticia de algún estudio que haya tratado la desamidación de una GDH.

Esta actividad enzimática está codificada por dos genes en *S. cerevisiae* (Avendaño *et al.*, 1997), por lo que en este organismo existen dos isoformas de NADP-GDH. La diferencia en el recambio de las isoenzimas de levadura es una posibilidad que vale la pena explorar, ya que podría representar otra forma de modulación diferencial.

Para explorar esta posibilidad, se llevó a cabo una inspección teórica de los residuos de Asn, con el fin de identificar aquellos que serían más susceptibles a la desamidación espontánea, con base en los criterios de Gracy *et al.* (1995).

El análisis *in silico* sugiere la importancia del sitio N54 que sólo esta presente en Gdh3p, ya que se predice que éste es el más susceptible a desamidación por sus características de secuencia y estructura tridimensional (Cuadro 1). Estas características son: su apareamiento con un residuo de Gly, su posición en la topología de la enzima (giro que une dos hojas  $\beta$  antiparalelas), y su exposición al solvente. Adicionalmente, se registran dos sitios compartidos que són lábiles en

menor grado (N170 y N210 en Gdh1, N171 y N211 en Gdh3p). Es un residuo de Ser el que se encuentra enseguida de la N170/171, mientras que el residuo N210/211 no se encuentra expuesto al solvente, situación que lo hace menos susceptible, en teoría, a la desamidación espontánea.

El conocimiento de estos sitios con diferente tendencia a la desamidación será el punto de partida para los trabajos experimentales que permitirán determinar la susceptibilidad de las NADP-GDHs de levadura a la desamidación espontánea *in vitro* e *in vivo*. Con un alto porcentaje de identidad en su secuencia de aminoácidos, pero diferencias en sus residuos de Asn, las isoenzimas de levadura son un buen modelo para estudiar la susceptibilidad a la desamidación espontánea de proteínas.

## REFERENCIAS

- Aswad, D.W. 1984.** Stoichiometric methylation of porcine adrenocorticotropin by protein carboxyl methyltransferase requires deamidation of asparagine 25. Evidence for methylation at the alpha-carboxyl group of atypical L-isoaspartyl residues. *J. Biol. Chem.* 259:10714-21.
- Aswad, D.W. 1995.** Introduction. *In: Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins.* Aswad, D.W. (Ed.), CRC Press, 1-6pp.
- Avendaño, A., De Luna, A., Valenzuela, L., Olivera, H. y González, A. 1997.** *GDH3* encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 197:5594-7.

**Brennan, T.V. and Clarke, S. 1995.** Deamidation and isoaspartate formation in model synthetic peptides: the effects of sequence and solution environment. *In: Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins.* Aswad, D.W. (Ed.), CRC Press, 65-90pp.

**Gracy, R.W., Yüksel, K.Ü. and Gómez-Puyou, A. 1995.** Deamidation of triosephosphate isomerase *in vitro* and *in vivo*. *In: Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins.* Aswad, DW (Ed.), CRC Press, 133-155pp.

**Johnson, B.A. and Aswad, D.W. 1995.** Deamidation and isoaspartate formation during *in vitro* aging of purified proteins. *In: Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins.* Aswad, D.W. (Ed.), CRC Press, 91-113pp.

**Ota, I.M. and Clarke, S. 1989.** Enzymatic methylation of isoaspartyl residues derived from aspartyl residues of affinity-purified calmodulin: the role of conformational flexibility in spontaneous isoaspartyl formation. *J. Biol. Chem.* 264:54-60.

**Robinson, A.B. and Rudd C.J. 1974.** Deamidation of glutamyl and asparaginyl residues in peptides and proteins. *Curr. Top. Cell. Regul.* 8:247-95.

**Sun, A.Q., Yüksel, K.Ü. and Gracy, R.W. 1992.** Relationship between the catalytic center and the primary degradation site of triosephosphate isomerase: effects of active site modification and deamidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 293:382-90.

**Takemoto, L.J. 1995.** Degradation of aspartyl and isoasparaginyl residues of lens proteins *in vivo*. *In: Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins.* Aswad, D.W. (Ed.), CRC Press, 157-165pp.

**Teshima, G., Hancock, W.S. and Canova-Davis, E. 1995.** Effect of deamidation and isoaspartate formation on the activity of proteins. *In: Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins.* Aswad, D.W. (Ed.), CRC Press, 167-191pp.

**Cuadro 1.** Características de los residuos de Asn en las estructuras tridimensionales de Gdh1p y Gdh3p. Se resaltan los residuos más susceptibles a la desamidación según los criterios de Gracy *et al.* (1995).

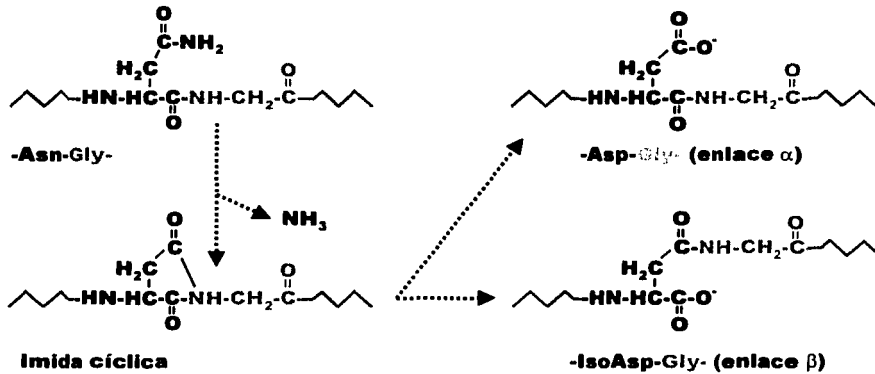
Gdh1p				Gdh3p			
Residuo Asn	secuencia	estructura secundaria	accesibil. relativa <sup>a</sup>	Residuo Asn	secuencia	estructura secundaria	accesibil. relativa <sup>a</sup>
51	W <u>EN</u> DK	$\beta$ 1	1	52	W <u>EN</u> DN	$\beta$ 1	1
				<del>54</del>	<del>ND</del> NGE	asa	<del>7</del>
67	QY <u>NS</u> A	asa	1	68	QF <u>NS</u> A	asa	1
84	SV <u>N</u> LS	asa	4	85	SV <u>N</u> LS	asa	4
99	FK <u>N</u> SL	$\alpha$ 4	1	100	FK <u>N</u> AL	$\alpha$ 4	1
122	RS <u>N</u> NE	$\alpha$ 5	5				
123	SN <u>N</u> EI	$\alpha$ 5	5	124	SR <u>N</u> EI	$\alpha$ 5	5
<del>170</del>	<del>YK</del> <u>N</u> SW	asa	<del>7</del>	<del>171</del>	<del>TK</del> <u>N</u> SW	asa	<del>7</del>
182	GL <u>N</u> WG	asa	5	183	GL <u>N</u> WG	asa	5
210	AT <u>N</u> GK	asa	3	211	AT <u>N</u> GK	asa	1
227	SG <u>N</u> VA	$\alpha$ 8	5	228	SG <u>N</u> VA	$\alpha$ 8	5
273	KV <u>N</u> FK	asa	5				
282	IV <u>N</u> EY	$\alpha$ 10	3				
290	SE <u>N</u> KV	asa	3				
				307	VS <u>N</u> VD	asa	3
317	TQ <u>N</u> EV	asa	5	318	TQ <u>N</u> EV	asa	5
340	GS <u>N</u> MG	asa	1	341	GA <u>N</u> MG	asa	5
				361	AT <u>N</u> AK	asa	2
374	AA <u>N</u> LG	asa	5	375	AA <u>N</u> LG	asa	2
409	MI <u>N</u> CF	$\alpha$ 15	5	410	MI <u>N</u> CF	$\alpha$ 14	5
412	CF <u>N</u> EC	$\alpha$ 15	4	413	CF <u>N</u> DC	$\alpha$ 14	4
				427	EK <u>N</u> TN	asa	8
436	GA <u>N</u> IA	$\alpha$ 16	1				

La estructura tridimensional es hipotética, con base en las estructuras cristalográficas de las proteínas homólogas en *Pyrococcus furiosus* y *Clostridium symbiosum* (Swiss-Model).

<sup>a</sup> Accesibilidad relativa con escala arbitraria de 1 a 10 (Swiss-PDB-Viewer). El valor máximo (10) considera residuos con más del 75% de su superficie accesible al solvente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

- Figura 1 -



**Figura 1.** Desamidación en una secuencia Asn-Gly. El nitrógeno  $\alpha$  de la Gly ataca al grupo amido de la Asn, resultando en la liberación de amonio (desamidación) y la formación de una imida cíclica (succinimida) como intermediario. La imida se hidroliza para generar una mezcla de residuos aspartil e isoaspartil (enlace- $\beta$ ). Tomado de Aswad (1984).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## REFERENCIAS

- Allen L.A., Zhao X.J., Caughey W., and Poyton R.O. (1995)** Isoforms of yeast cytochrome c oxidase subunit V affect the binuclear reaction center and alter the kinetics of interaction with the isoforms of yeast cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 270, 110–8.
- Aswad D.W. (1995)** Introduction. In *Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins* (Aswad D.W., ed). CRC Press, pp. 1–6.
- Avendaño A., DeLuna A., Olivera H., Valenzuela L., and González A. (1997)** GDH3 encodes a glutamate dehydrogenase isozyme, a previously unrecognized route for glutamate biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 197, 5594–7.
- Baker P.J., Britton K.L., Engel P.C., Farrants G.W., Lilley K.S., Rice D.W., and Stillman T.J. (1992)** Subunit assembly and active site location in the structure of glutamate dehydrogenase. *Proteins* 12, 75–86.
- Baumgartner U., Hamilton B., Piskacek M., Rius H., and Rottensteiner H. (1999)** Functional analysis of the Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> transcription factors Oaf1p and Pip2p. Different roles in fatty acid induction of  $\beta$ -oxidation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 22208–16.
- Benachenhou-Lahfa N., Forterre P., and Labendan B. (1993)** Evolution of glutamate dehydrogenase genes: evidence for two paralogous protein families and unusual branching patterns of the archaeobacteria in the universal tree of life. *J. Mol. Evol.* 36, 335–46.
- Bird A.P. (1995)** Gene number, noise reduction and biological complexity. *Trends Genet.* 11, 94–100.
- Blandin G., Durrens P., Tekaia F., Aigle M., Bolotin-Fukuhara M., Bon E., Casaregola S., de Montigny J., Gaillardin C., Lepingle A., et al. (2000)** Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 4. The genome of *Saccharomyces cerevisiae* revisited. *FEBS Lett.* 487, 31–6.
- Bon E., Neuvéglise C., Casaregola S., Artiguenave F., Wincker P., Aigle M., and Durrens P. (2000)** Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 5. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *FEBS Lett.* 487, 37–41.
- Boy-Marcotte E., Perrot M., Bussereau F., Boucherie H., and Jacquet M. (1998)** Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 180, 1044–52.

- Britton K.L., Baker P.J., Engel P.C., Rice D.W., and Stillman T.J. (1993)** Evolution of substrate diversity in the superfamily of amino acid dehydrogenases. Prospects for rational chiral synthesis. *J. Mol. Evol.* 234, 938–45.
- Britton K.L., Baker P.J., Rice D.W., and Stillman T.J. (1992)** Structural relationship between the hexameric and tetrameric family of glutamate dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* 209, 851–9.
- Britton K.L., Yip K.S.P., Sedelnikova S.E., Stillman T.J., Adams M.W.W., Ma K., Maeder D.L., Rob F.T., Tolliday N., Vetriani C., et al. (1999)** Structure determination of the glutamate dehydrogenase from the hyperthermophile *Thermococcus litoralis* and its comparison with that from *Pyrococcus furiosus*. *J. Mol. Biol.* 293, 1121–32.
- Brookfield J.F.Y. (1997)** Genetic redundancy. *Adv. Genet.* 36, 137–55.
- Brown T.A. (1999)** *Genomes*. John Wiley and Sons Inc., New York, pp. 372–83.
- Camardella L., Di Prisco G., Garofano F., and Guerrini A.M. (1976)** Purification and properties of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from yeast nuclear fractions. *Biochim. Biophys Acta* 429, 324–30.
- Cogoni C., Valenzuela L., González-Halphen D., Olivera H., Macino G., Ballario P., and González A. (1995)** *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high-molecular-weight polypeptide. *J. Bacteriol.* 177, 792–8.
- Cooper T.G. (1982)** Nitrogen metabolism. In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae, Vol. 2, Metabolism and Gene Expression* (Strathern J.N., Jones E.W., and Broach J.R., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 39–99.
- Coschigano P.W., Miller S.M., and Magasanik B. (1991)** Physiological and genetic analysis of the carbon regulation of the NAD-dependent glutamate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4455–65.
- Cox K.H., Pinchak A.B., and Cooper T.G. (1999)** Genome-wide transcriptional analysis in *S. cerevisiae* by mini-array membrane hybridization. *Yeast* 15, 703–13.
- Dang V.D., Bohn C., Bolotin-Fukuhara M., Daignan-Fornier B. (1996)** The CCAAT box-binding factor stimulates ammonium assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*, defining a new cross-pathway regulation between nitrogen and carbon metabolisms. *J. Bacteriol.* 178, 1842–9.
- Daugherty J.R., Rai R., El Berry H.M., and Cooper T.G. (1993)** Regulatory circuit for responses of nitrogen catabolic gene expression to the GLN3 and DAL80 proteins and nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 175, 64–73.
- DeRisi J.L., Iyer V.R., and Brown P.O. (1997)** Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680–6.

- Di Fraia R., Wilquet V., Ciardiello M.A., Carratore V., Antignami A., Camardella L., Glandsdorff N., and di Prisco G. (2000)** NADP<sup>+</sup>-dependent glutamate dehydrogenase in the arctic psychrotolerant bacterium *Psychrobacter* sp. TAD1. Characterization, protein and DNA sequence, and relationship to other glutamate dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* 267, 121–31.
- Dickinson J.R. (1999a)** Carbon metabolism. In *The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae* (Dickinson J.R., and Schweizer M., eds.). Taylor and Francis, London, pp. 23–56.
- Dickinson J.R. (1999b)** Nitrogen metabolism. In *The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae* (Dickinson J.R., and Schweizer M., eds.). Taylor and Francis, London, pp. 57–78.
- Drgon T., Sabova L., Gavurnikova G., and Kolarov J. (1992)** Yeast ADP/ATP carrier (AAC) proteins exhibit similar enzymatic properties but their deletion produces different phenotypes. *FEBS Lett.* 304, 277–80.
- Drillien R., and Lacroute F. (1972)** Ureidosuccinic acid uptake in yeast and some aspects of its regulation. *J. Bacteriol.* 109, 203–8.
- Dujon B. (1996)** The yeast genome project: what did we learn? *Trends Genet.* 12, 263–70.
- Duncan P.A., White B.A., and Mackie R.I. (1992)** Purification and properties of NADP-dependent glutamate dehydrogenase from *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 4032–7.
- Escamilla M. (2002)** Uso de la proteína verde fluorescente para la localización subcelular de proteínas en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Forsburg S.L., and Guarente L. (1989)** Identification and characterization of *HAP4*: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes Dev.* 3, 1166–78.
- Fourcade A. (1969)** Yeast glutamate dehydrogenase. Purification and properties. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)* 50, 1671–9.
- Fraenkel D.G. (1982)** Carbohydrate metabolism. In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae, Metabolism and Gene Expression* (Strathern J.N., Jones E.W., and Pringle J.R., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 1–38.
- Fredrickson A.G., and Stephanopoulos G. (1981)** Microbial competition. *Science* 213, 972–9.
- Friedman R., and Hughes A.L. (2001)** Gene duplication and the structure of eukaryotic genomes. *Genome Res.* 11, 373–81.
- Fuge E.K., Braun E.L., Werner-Washburne M. (1994)** Protein synthesis in long-term stationary-phase cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 176, 5802–13.



- Gibson T.J., and Spring J. (1998)** Genetic redundancy in vertebrates: polyploidy and persistence of genes encoding multidomain proteins. *Trends Genet.* 14, 46–9.
- Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., et al. (1996)** Life with 6,000 genes. *Science* 274, 546–67.
- González A., Rodríguez L., Folch J., Soberón M., and Olivera H. (1987)** Coordinated regulation of ammonium assimilation and carbon catabolism by glyoxylate in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 133, 2497–501.
- Grenson M. Dubois E., Piotrowska M., Drillien R., and Aigle M. (1974)** Ammonia assimilation in *Saccharomyces cerevisiae* as mediated by the two glutamate dehydrogenases. Evidence for the *gdhA* locus being the structural gene for the NADP-dependent glutamate dehydrogenase. *Mol. Gen. Genet.* 128, 73–85.
- Helling R.B. (1994)** Why does *Escherichia coli* have two primary routes for synthesis of glutamate? *J. Bacteriol.* 176, 4664–8.
- Hemmila I.A., and Mantsala P.I. (1978)** Purification and properties of glutamate synthase and glutamate dehydrogenase from *Bacillus megaterium*. *Biochem J.* 173, 45–52.
- Hemmings B.A., Zubenko G.S., and Jones E.W. (1980)** Proteolytic inactivation of the NADP-dependent glutamate dehydrogenase in proteinase-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 202, 657–60.
- Henikoff S., Greene E.A., Pietrokovski S., Bork P., Attwood T.K., and Hood L. (1997)** Gene families: the taxonomy of protein paralogs and chimeras. *Science* 278, 609–14.
- Hinnebusch A.G. (1992)** General and pathway-specific regulatory mechanisms controlling synthesis of amino acid biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces cerevisiae, Vol. 2, Metabolism and Gene Expression* (Jones E.W., Pringle J.R., and Broach J.R., eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 319–414.
- Holzer H., und Schneider S. (1957)** Anreicherung und Trennung einer DPN-spezifischen und einer TPN-spezifischen Glutaminsäure Dehydrogenase aus Hefe. *Biochem. Z.* 328, 361–7.
- Hu Y., Cooper T.G., and Kohlhaw G.B. (1995)** The *Saccharomyces cerevisiae* Leu3 protein activates expression of *GDH1*, a key gene in nitrogen assimilation. *Mol. Cell. Biol.* 15, 52–7.
- Hudson R.C., and Daniel R.M. (1993)** L-Glutamate dehydrogenases: distribution, properties and mechanism. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B, 767–92.
- Hughes A.L. (1999)** Phylogenies of developmentally important proteins do not support the hypothesis of two rounds of genome duplication early in vertebrate history. *J. Mol. Evol.* 48, 565–76.

- Janes B.K., Pomposiello P.J., Perez-Matos A., Najarian D.J., Goss T.J., and Bender R.A. (2001)** Growth inhibition caused by overexpression of the structural gene for glutamate dehydrogenase (*gdhA*) from *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* 183, 2709–14.
- Kang L., Keeler M.L., Dunlop P.C., and Roon R.J. (1982)** Nitrogen catabolite repression in a glutamate auxotroph of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 151, 29–35.
- Keogh R.S., Seoighe C., Wolfe K.H. (1998)** Evolution of gene order and chromosome number in *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and related fungi. *Yeast* 14, 443–57.
- Kirschner M., and Gerhart J. (1998)** Evolvability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 8420–7.
- Kumar A., and Snyder M. (2001)** Emerging technologies in yeast genomics. *Nat. Rev. Genet.* 2, 302–12.
- Kwast K.E., Burke P.V., and Poyton R.O. (1998)** Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J. Exp. Biol.* 201, 1177–95.
- Lascu I., Barzu T., Ty N.G., Ngoc L.D., Barzu O., and Mantsch H.H. (1977)** Regulatory effects of purine nucleotide analogs with liver glutamate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* 482, 251–60.
- Liu Z., and Butow R. (1999)** A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to reduction or loss of respiratory function. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6720–8.
- Llorente B., Malpertuy A., Neuveglise C., de Montigny J., Aigle M., Artiguenave F., Blandin G., Bolotin-Fukuhara M., Bon E., Brottier P., et al. (2000)** Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 18. Comparative analysis of chromosome maps and synteny with *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 487, 101–12.
- Lynch M., and Force A. (2000)** The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154, 459–73.
- Masters D.S., and Meister A. (1982)** Inhibition by homocysteine sulfonamide of glutamate synthase purified from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 257, 8711–5.
- Mazón M.J., and Hemmings B.A. (1979)** Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent glutamate dehydrogenase by proteolysis during carbon starvation. *J. Bacteriol.* 139, 686–9.
- Melo-Oliveira R., Oliveira I.C., and Coruzzi G.M. (1996)** *Arabidopsis* mutant analysis and gene regulation define a nonredundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 4718–23.
- Merrick M.J., and Edwards R.A. (1995)** Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* 59, 604–22.

- Mewes H.W., Albermann K., Bahr M., Frishman D., Gleissner A., Hani J., Heumann K., Kleine K., Maierl A., Oliver S.G., et al. (1997)** Overview of the yeast genome. *Nature* 387(Suppl.), 7–65.
- Miller S.M., and Magasanik B. (1991)** Role of NAD-linked glutamate dehydrogenase in nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 172, 4927–35.
- Miñambres B., Olivera E.R., Jensen R.A., and Luengo J.M. (2000)** A new class of glutamate dehydrogenases (GDH). Biochemical and genetical characterization of the first member, the AMP-requiring NAD-specific GDH of *Streptomyces clavuligerus*. *J. Biol. Chem.* 275, 39529–42.
- Møller K., Olsson L., and Piškur J. (2001)** Ability for anaerobic growth is not sufficient for development of the petite phenotype in *Saccharomyces kluyveri*. *J. Bacteriol.* 183, 2485–9.
- Mora J. (1990)** Glutamine metabolism and cycling in *Neurospora crassa*. *Microbiol. Rev.* 54, 293–304.
- Mountain A., McPherson M.J., Baron A.J., and Wootton J.C. (1995)** The *Klebsiella aerogenes* glutamate dehydrogenase (*gdhA*) gene: cloning, high-level expression and hybrid enzyme formation in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 199, 141–5.
- Ninfa A.J., Jiang P., Atkinson M.R., and Peliska J.A. (2000)** Integration of antagonistic signals in the regulation of nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Curr. Top. Cell Regulat.* 36, 31–75.
- Nowak M.A., Boerlijst M.C., Cooke J., and Maynard Smith J. (1997)** Evolution of genetic redundancy. *Nature* 388, 167–71.
- Ohno S. (1970)** *Evolution by Gene Duplication*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Pearce D.A., and Sherman F. (1997)** Differential ubiquitin-dependent degradation of the yeast apocytochrome c isozymes. *J. Biol. Chem.* 272, 1829–36.
- Perysinakis A., Kinghorn J.R., and Drinas C. (1994)** Biochemical and genetical studies of NADP-specific glutamate dehydrogenase in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* 26, 315–20.
- Peterson P.E., and Smith T.J. (1999)** The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery. *Structure Fold Des.* 7, 769–82.
- Peterson P.E., Pierce J., and Smith T.J. (1997)** Crystallization and characterization of bovine liver glutamate dehydrogenase. *J. Struct. Biol.* 120, 73–7.
- Piškur J. (2001)** Origin of the duplicated regions in the yeast genomes. *Trends Genet.* 17, 302–3.
- Reitzer L.J., and Magasanik B. (1987)** Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. In *Escherichia coli and Salmonella*

- typhimurium: Cellular and Molecular Biology* (Neidhardt F.C., ed). American Society for Microbiology, Washington D.C., pp. 302–36.
- Riego L., Avendaño A., DeLuna A., Rodríguez E., and González A. (2002)** Transcriptional analysis of the NADP-glutamate dehydrogenase (*GDH1*) of *Saccharomyces cerevisiae*. Positive regulation by *GLN3*, *GCN4*, and *HAP4* during respiratory growth. (artículo en preparación)
- Romero D., and Palacios R. (1997)** Gene amplification and genomic plasticity in prokaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 31, 91–111.
- Romero M., Guzman-Leon S., Aranda C., Gonzalez-Halphen D., Valenzuela L., and Gonzalez A. (2000)** Pathways for glutamate biosynthesis in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology-UK* 146, 239–45.
- Rubin G.M., Yandell M.D., Wortmann J.R., Miklos G.L.G., Nelson C.R., Hariharan I.K., Fortini M.E., Li P.W., Apweiler R., Fleischmann W., et al. (2000)** Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287, 2204–15.
- Sakamoto N., Kotre A.M., and Savageau M.A. (1975)** Glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli*: purification and properties. *J. Bacteriol.* 124, 775–83.
- Sankoff D. (2001)** Gene and genome duplication. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 681–4.
- Schwelenberg H.G., Kang H.A., and Hershey J.W. (1993)** Translation initiation factor eIF-5A expressed from either of two yeast genes or from human cDNA. Functional identity under aerobic and anaerobic conditions. *J. Biol. Chem.* 268, 14018–25.
- Seoighe C., and Wolfe K.H. (1999a)** Yeast genome evolution in the post-genome era. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 548–54.
- Seoighe C., and Wolfe K.H. (1999b)** Updated map of duplicated regions in the yeast genome. *Gene* 238, 253–61.
- Sherman F. (1991)** Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* 194, 3–21.
- Sidow A. (1996)** Gen(om)e duplications in the evolution of early vertebrates. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 715–22.
- Smith E.L. (1975)** Glutamate dehydrogenases. In *The Enzymes, Vol XI* (Boyer P.D., ed). Academic Press, Inc., New York, pp. 293–367.
- Souciet J., Aigle M., Artiguenave F., Blandin G., Bolotin-Fukuhara M., Bon E., Brottier P., Casaregola S., de Montigny J., Dujon B., et al. (2000)** Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 4. A set of yeast species for molecular evolution studies. *FEBS Lett.* 487, 3–12.

- Springael J.Y., Galan J.M., Haguenaer-Tsapis R., and Andre B. (1999)** NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-induced down-regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Gap1p permease involves its ubiquitination with lysine-63-linked chains. *J. Cell Sci.* 112, 1375–83.
- Tempest D.W., Meers J.L., and Brown C.M. (1970)** Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by hitherto unknown route. *Biochem. J.* 117, 405–507.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000)** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796–815.
- Valenzuela L., Ballario P., Aranda C., Filetici P., and González A. (1998)** Regulation of expression of *GLT1*, the gene encoding glutamate synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 180, 3533–40.
- van Riel N.A., Giuseppin M.L., TerSchure E.G., and Verrips C.T. (1998)** A structured, minimal parameter model of the central nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the prediction of the behavior of mutants. *J. Theor. Biol.* 191, 397–414.
- Venard R., Jallon J.M., Fourcade A., and Iwatsubo M. (1975)** Binding studies of NADPH to NADP-specific L-glutamate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 57, 371–8.
- Wagner A. (2000)** The role of population size, pleiotropy and fitness effects of mutations in the evolution of overlapping gene functions. *Genetics* 154, 1389–401.
- Waterland R.A., Basu A., Chance B., and Poyton R.O. (1991)** The isoforms of yeast cytochrome c oxidase subunit V alter the *in vivo* kinetic properties of the holoenzyme. *J. Biol. Chem.* 266, 4180–6.
- Watson J.D., Gilman M., Witowski J., and Zoller M. (1992)** *Recombinant DNA*. W.H. Freeman and Company, New York, pp. 235–53.
- West S.M., and Price N.C. (1988)** The unfolding and refolding of glutamate dehydrogenases from bovine liver, baker's yeast and *Clostridium symbiosum*. *Biochem. J.* 251, 135–9.
- Wolfe K.H. (2001)** Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nat. Rev. Genet.* 2, 333–41.
- Wolfe K.H., and Shields D.C. (1997)** Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387, 708–13.
- Yip K.S.P., Stillman T.J., Britton K.L., Artymiuk P.J., Baker P.J., Sedelnikova S.E., Engel P.C., Pasquo A., Chiaraluce R., and Consalvi V. (1995)** The structure of *Pyrococcus furiosus* glutamate dehydrogenase reveals a key role for iron-pair network in maintaining enzyme stability at extreme temperatures. *Structure* 3, 1147–58.